

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hosen; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEVOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIVOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

*Reprinted by*  
**TOA BOOK EXPORTS, INC.**

Tokyo Kosho Kaikan Building  
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo  
CABLE: Toaperiodical, Tokyo  
PHONE: Tokyo 291-1448





## BEITRÄGE ZUR BESTIMMUNG DER BLUTGALLENSÄUREN.

### II. Mitteilung.

#### Eine neue in der Praxis leicht ausführbare Bestimmungsmethode der Gallensäuren im Blutserum.

VON

KENZO KUSUI.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von  
Prof. Dr. S. Tsunoo, Nagasaki.)

(Eingegangen am 10. Juli 1933)

Wenn man die Gallensäuren im Blut bzw. Blutserum mittels der Pettenkoferschen Reaktion kolorimetrisch bestimmen will, muss man zuerst alle anderen ähnliche Farbenreaktion gebenden Substanzen möglichst beseitigen; und dabei muss der Verlust an Gallensäuren so gering wie möglich gehalten werden. M. Aldrich und M. S. Bledsoe (1928) glaubten zu diesem Ziel gelangt zu sein, indem sie den Blutalkoholextrakt mit Norit, Baryumhydroxyd und Äther behandelten. Aber Charlet (1929) und Kusui (1932) konstatierten aus ihren eigenen Untersuchungsergebnissen, dass eine ziemlich grosse Menge der Blutgallensäuren nach Ablauf der Prozedur der Aldrichschen Methode verloren gingen. Dabei vermutete Charlet, dass dieser Verlust sehr wahrscheinlich bei der Ätherextraktion entstehe. Dagegen konnte ich erweisen, dass die Gallensäuren an Norit und Bariumsulfat adsorbiert werden, und schloss daraus in meiner ersten Mitteilung, dass die Aldrichsche Methode in ihrer originalen Form für die Praxis nicht mehr tauglich ist.

Ich machte die Erfahrung, dass die Intensität der Pettenkoferschen Reaktion, die die sehr verdünnten alkoholischen Glykocholsäurelösungen (0,00125–0,04%) durch Zusatz einer mässigen Menge von Rohrzuckerlösung und konzentrierter Schwefelsäure und durch Durchschütteln ergeben, entsprechend

der Konzentration der Glykocholsäure eine Farbenabstufung zeigt. Durch diese Tatsache veranlasst, unternahm ich zuerst die Herstellung von Standardlösungen der Glykocholsäure. Weiter untersuchte ich die nötigen und genügenden Bedingungen, um den Verlust der Gallensäuren im Blutserum so gering wie möglich zu machen und andere Pettenkofersehe Reaktion gebende Substanzen möglichst vollständig zu beseitigen. Mit Rücksicht auf diese Bedingungen bringe ich hier eine neue Bestimmungsmethode der Gallensäuren im Blutserum in Vorschlag. Und weiter konstatiere ich die Anwendbarkeit dieser Methode auch zur Bestimmung der Gallensäuren in der Lymphe.

### Untersuchungsergebnisse.

#### I. HERSTELLUNG DER STANDARDLÖSUNGEN.

Zur Herstellung der Standardlösungen wird umkristallisierte Glykocholsäure gebraucht. Die 0,08%ige alkoholische Stammlösung wird mit aufsteigenden Mengen von Alkohol so exakt verdünnt, dass die Konzentrationen der Standardlösungen jetzt 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,0025 und 0,00125% betragen. Je 2,0 ccm dieser Lösungen werden in eine Eprouvette pipettiert und mit 0,2 ccm 1%iger Rohrzuckerlösung und 2,0 ccm konzentrierter Schwefelsäure (Merek) versetzt. Jedes Reagenzrohr wird 30 Sekunden lang geschüttelt und dann 1 Minute lang in Eiswasser gekühlt, um die weitere Farbenentwicklung zu verhindern. Die Lösungen enthalten 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 resp. 0,8 mg Glykocholsäure. Ausserdem wird noch eine Lösung die keine Glykocholsäure, sondern nur Zuckerlösung und Schwefelsäure in entsprechenden Mengen enthält, als Kontrolllösung hergestellt. Die Lösungen, die alle *ceteris paribus* ganz gleich behandelt werden, ergeben je nach dem Gallensäuregehalt ungefähr die folgenden Farbtöne, obgleich es sehr schwer ist, die Farben exakt zu beschreiben:

0 .....	Ein schönes Gelb.
0,025 mg .....	Helles Orange.
0,050 mg .....	Helles Orangerot mit gelblicher Nuance.

0,100 mg. . . . . Helles Orangerot.

0,200 mg. . . . . Rosarot.

0,400 mg. . . . . Rosarot mit purpurner Nuance.

0,800 mg. . . . . Purpurrot.

Diese gefärbten Lösungen werden nun der Reihe nach miteinander kolorimetrisch verglichen.

Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

		Glykocholsäuremenge in Standardlösungen in mg. Die Skala steht immer auf 15 mm.									
		0,05		0,10		0,20		0,40		0,80	
		Theor. Skala mm	Exp. Skala mm	Theor. Skala mm	Exp. Skala mm	Theor. Skala mm	Exp. Skala mm	Theor. Skala mm	Exp. Skala mm	Theor. Skala mm	Exp. Skala mm
Glykocholsäuremenge in den zu untersuchenden Lösungen (mg)	0		30,0								
	0,025	30,0	22,5 22,5								
	0,050	15,0	15,2 15,5 15,0	30,0	22,3 22,5 22,0						
	0,100			15,0	15,2 15,0 15,2	30,0	22,3 22,5 22,2				
	0,200			7,5	10,2 10,0 10,0	15,0	15,0 15,2 15,0	30,0	30,0 29,8 30,1		
	0,400					7,5	7,5 7,5 7,5	15,0	15,2 15,0 15,0	30,0	30,0 29,8 30,0
	0,800							7,5	7,5 8,0 7,5	15,0	15,0 15,0

Aus dieser Tabelle ersicht man, dass die Farbenabstufung sich nicht in allen Gebieten proportional zu der Konzentration der Glykocholsäure verändert, sondern dass ein besonderes Verhältnis in den Gebieten von 0,025 bis 0,2 mg besteht. Auf Grund dieser



Tatsache stellte ich eine empirische Tabelle her, die die Menge der Gallensäuren, die der Skala der zu untersuchenden Lösungen entspricht, wenn die Skala der Standardlösungen immer auf 15,0 mm steht, in mg-Zahl der Glykocholsäure zeigt (Tabelle II).

TABELLE II.

Skala mm	Glykocholsäuremenge in Standardlösungen in mg.					
	0,025	0,050	0,100	0,200	0,400	0,800
	Gallensäurenmenge in den zu untersuchenden Lösungen in mg(a)					
22,5		0,025	0,050	0,100	0,267	0,533
22,2		0,026	0,052	0,104	0,270	0,541
21,9		0,027	0,054	0,108	0,274	0,548
21,6		0,028	0,056	0,112	0,278	0,555
21,3		0,029	0,058	0,116	0,282	0,563
21,0		0,030	0,060	0,120	0,286	0,571
20,7		0,031	0,062	0,124	0,290	0,579
20,4		0,032	0,064	0,128	0,294	0,588
20,1		0,033	0,066	0,132	0,298	0,595
19,8		0,034	0,068	0,136	0,303	0,606
19,5		0,035	0,070	0,140	0,308	0,615
19,2		0,036	0,072	0,144	0,313	0,625
18,9		0,037	0,074	0,148	0,317	0,635
18,6		0,038	0,076	0,152	0,322	0,645
18,3		0,039	0,078	0,156	0,328	0,655
18,0		0,040	0,080	0,160	0,333	0,667
17,7		0,041	0,082	0,164	0,339	0,678
17,4		0,042	0,084	0,168	0,345	0,689
17,1		0,043	0,086	0,172	0,351	0,701
16,8		0,044	0,088	0,176	0,357	0,714
16,5		0,045	0,090	0,180	0,364	0,727
16,2		0,046	0,092	0,184	0,370	0,740
15,9		0,047	0,094	0,188	0,377	0,754
15,6		0,048	0,096	0,192	0,384	0,768
15,3		0,049	0,098	0,196	0,392	0,784
15,0	0,025	0,050	0,100	0,200	0,400	0,800
14,5		0,055	0,110	0,207	0,414	0,828
14,0	0,030	0,060	0,120	0,214	0,428	0,856
13,5		0,065	0,130	0,222	0,444	0,889
13,0	0,035	0,070	0,140	0,231	0,461	0,923
12,5		0,075	0,150	0,240	0,480	0,960
12,0	0,040	0,080	0,160	0,250	0,500	1,000
11,5		0,085	0,170	0,261	0,522	1,044
11,0	0,045	0,090	0,180	0,273	0,545	1,091
10,5		0,095	0,190	0,286	0,571	1,143
10,0	0,050	0,100	0,200	0,300	0,600	1,200

Diese Standardlösungen sind nicht haltbar. Sie müssen also jedesmal bei der Bestimmung der Gallensäuren aus der oben-  
genannten Stammlösung frisch hergestellt werden.

## II. DIE PETTENKOFERSCHE REAKTION DES CHOLESTERINS UND DIE EXTRAHIERBARKEIT DES CHOLESTERINS, DER GLYKOCHOLSÄURE UND DES NATRIUMGLYKOCHOLATES MIT ÄTHER.

Mylius (1887) hat den Nachweis erbracht, dass die Entstehung der kirschroten bis blauen Färbung, welche bei der Pettenkoferschen Reaktion als Erkennungszeichen für die Anwesenheit von Gallensäuren betrachtet wird, ihre Erklärung darin findet, dass aus dem zur Reaktion angewendeten Rohrzucker unter Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure Furfurol abgespalten wird, und dieses dann mit den Gallensäuren schön gefärbte Reaktionsprodukte gibt. Derselbe Forscher und Udránszky (1888) zeigten dann ferner, dass nicht nur die Gallensäuren, sondern auch andere, verschiedenen Gruppen chemischer Körper angehörige Substanzen mit Furfurol und konzentrierter Schwefelsäure ähnliche oder ganz gleiche Farbererscheinungen erkennen lassen. Zu diesen Substanzen gehört das Cholesterin, das im Blut in ziemlich grosser Menge enthalten ist, so dass das Cholesterin hier besonders berücksichtigt werden muss. Ausserdem dürfen die Fettsubstanzen als auch die Pettenkofersche Reaktion gebende Körper nicht ausser Acht gelassen werden.

### A. *Die Pettenkofersche Reaktion des Cholesterins und die Extrahierbarkeit des Cholesterins mit Äther.*

Einerseits wurden je 2,0 ccm der alkoholischen Cholesterin (Merck)-Lösung von verschiedener Konzentration in eine Eprouvete pipettiert, mit 0,2 ccm 1%iger Rohrzuckerlösung und 2,0 ccm konzentrierter Schwefelsäure (Merck) versetzt. Das Reagenzrohr wurde 30 Sekunden lang geschüttelt, dann 1 Minute lang in Eiswasser gekühlt, um die weitere Farbenentwicklung zu verhindern, und innerhalb 30 Minuten mit einer möglichst gleichfarbigen Vergleichslösung kolorimetrisch verglichen. Andererseits wurde die gleiche Menge der entsprechenden alkoholischen Cholesterinlösungen in einem Becher von 50 ccm auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer getrocknet. Der Rückstand wurde mit 2,0 ccm Äther einigemal extrahiert. Der in Äther



nicht übergehende Teil wurde wieder in 3,0 ccm Alkohol gelöst. 2,0 ccm dieser alkoholischen Lösung wurden in eine Eprouvette pipettiert; und auf die oben beschriebene Weise wurde die Pettenkofersche Reaktion angestellt. Schliesslich wurden die erhaltenen Werte beider Versuchsreihen miteinander verglichen. Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

TABELLE III.

Ursprüngl. Menge des Cholesterins in 2,0 ccm alkoholischer Lösung in mg	Pettenkofer- wert vor der Äther- extraktion in mg	Ätherextraktion		Pettenkofer- wert nach der Äther- extraktion in mg
		Menge des Äthers in ccm	Das wievielte Mal der Extraktion	
0,100	0,075	2,0	1	0
0,200	0,150	2,0	1	0
0,400	0,304	2,0	1	0
1,000	0,765	2,0	1	0
5,000	—	2,0	1	0,450
5,000	—	2,0	2	0
10,000	—	2,0	1	1,200
10,000	—	2,0	2	+ unmessbar
10,000	—	2,0	3	0

Aus dieser Tabelle stellt sich heraus, dass 10,0 mg Cholesterin mit  $3 \times 2,0$  ccm Äther fast restlos extrahiert werden können, und dass eine bestimmte Menge Cholesterin in der Intensität der Pettenkoferschen Reaktion einer um ca 25% geringeren Glykocholsäuremenge entspricht.

#### B. Extrahierbarkeit der Glykocholsäure mit Äther.

Je 2,0 ccm alkoholische Glykocholsäurelösung von verschiedener Konzentration wurden in einem Becher von 50 ccm auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde mit 2,0 ccm Äther dreimal extrahiert. Der in Äther nicht übergegangene Rest wurde in 3,0 ccm Alkohol gelöst. An 2,0 ccm dieser Alkohollösung wurde



die zurückgebliebene Glykocholsäure kolorimetrisch wie beim Cholesterinversuche ermittelt.

Tabelle IV zeigt die Resultate.

TABELLE IV.

Ursprüngliche Glykocholsäure- menge in mg	Wiedergefundene Menge der Glykocholsäure in mg
0,050	0,045
0,100	0,093
0,200	0,185
0,200	0,190
0,400	0,386
0,800	0,768
1,000	0,980
1,000	0,986
1,000	0,980

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich, gehen in den Gebieten von 0,05 bis 1,0 mg nur 2–10% der ursprünglichen Glykocholsäuremenge durch dreimalige Extrahierung mit 2,0 ccm Äther verloren.

#### *C. Versuche mit Cholesterin-Glykocholsäuregemisch.*

In den beiden oben genannten Versuchsreihen konstatierte ich die grosse Löslichkeit des Cholesterins gegenüber der ganz geringen Löslichkeit der Glykocholsäure in Äther. Bei den biologischen Untersuchungen ist es aber sehr wichtig, im voraus festzustellen, ob diese Löslichkeitsverhältnisse auch im Cholesterin-Glykocholsäuregemisch bestehen. Zur Aufklärung dieser Frage wurde eine Reihe von Gemischen verschiedener Mengen von alkoholischen Cholesterin- und Glykocholsäurelösungen von bekannter Konzentration auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer bis zum Trocknen eingedampft. Der Rückstand wurde weiter wie H. B. behandelt.

Die Resultate sind in Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V.

Ursprüngliche Menge		Pettenkoferwert nach der Ätherextraktion in mg
der Glykocholsäure in mg	des Cholesterins in mg	
0,1	0,8	0,090
0,1	0,8	0,088
0,2	0,8	0,185
0,2	0,8	0,190
0,4	0,8	0,376
0,4	0,8	0,366
0,8	0,8	0,810
0,8	0,8	0,796
1,0	1,0	0,928
1,0	1,0	0,964
1,0	5,0	0,997
1,0	5,0	1,008
0,4	5,0	0,376
0,4	5,0	0,403
0,8	10,0	0,810
0,8	10,0	0,804

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Glykocholsäuremenge, die nach der Ätherextraktion noch im Rückstand enthalten sein sollte und die aus der Intensität der Pettenkofer'schen Reaktion kolorimetrisch berechnet wurde, gerade der ursprünglichen Menge der Glykocholsäure annähernd entspricht. Also darf man mit Recht annehmen, dass auch aus dem Cholesterin-Glykocholsäuregemisch durch Äther das Cholesterin fast vollständig entfernt wird, während die Glykocholsäure nur ganz wenig resp. gar nicht verloren geht.

*D. Extrahierbarkeit des Natriumglykocholates  
mit Äther.*

Eine bestimmte Menge einer mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Natriumglykocholat (Merek)-Lösung von bekannter Konzentration wurde in einem Becherglas von 50 ccm

auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell getrocknet. Der Rückstand wurde mit  $3 \times 2,0$  ccm Äther extrahiert. Der in Äther nicht übergehende Rückstand wurde in 3,0 ccm Alkohol gelöst. An 2,0 ccm dieser alkoholischen Lösung wurde die zurückgebliebene Glykocholsäure kolorimetrisch auf oben genannte Weise bestimmt. Als Kontrollversuch wurde auch an den Natriumglykocholatlösungen von bekannter Konzentration ihr Glykocholsäuregehalt ohne Ätherextraktion kolorimetrisch untersucht.

Die Resultate sind wie folgt (Tabelle VI).

TABELLE VI.

Ursprüngliche Menge des Na-glykocholates in mg	Pettenkoferwert ohne Ätherextraktion in mg	Pettenkoferwert nach der Ätherextraktion in mg
0,10	0,070	0,060
0,10	0,070	0,065
0,20	0,143	0,128
0,20	0,139	0,128
0,40	0,277	0,280
0,40	0,280	0,280
0,70	0,488	0,473
0,70	0,484	0,473
0,80	0,560	0,543
1,00	0,703	0,703
1,00	•0,703	0,694

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass das Natriumglykocholat (Merck) bei Anwendung meiner Methode ungefähr 70% Glykocholsäure ergibt und dass das Natriumglykocholat auch mit Äther kaum extrahierbar ist.

#### *E. Versuche mit Cholesterin-Natriumglykocholatgemisch.*

Um die Löslichkeit des Natriumglykocholates in Äther auch in Anwesenheit des Cholesterins zu prüfen, wurde der Rückstand eines Gemisches, das aus einer bestimmten Menge von Cholesterin und glykocholsaurem Natrium bestand, mit 2,0 ccm Äther dreimal



extrahiert. Der mit Äther nicht extrahierbare Rückstand wurde dann in 3,0 ccm Alkohol gelöst. An 2,0 ccm dieser alkoholischen Lösung wurde die Menge der zurückgebliebenen, Pettenkofersehe Reaktion gebenden Substanzen kolorimetrisch bestimmt.

Die Resultate wurden in Tabelle VII zusammengestellt.

TABELLE VII.

Ursprüngliche Menge des		Pettenkoferwert nach der
Natriumglykocholates in mg	Cholesterins in mg	Ätherextraktion in mg
0,10	0,80	0,065
0,10	0,80	0,060
0,20	0,80	0,132
0,20	1,00	0,136
0,20	5,00	0,136
0,20	10,00	0,145
0,40	1,00	0,267
0,40	1,00	0,277
0,80	5,00	0,570
0,80	5,00	0,574
1,00	0,80	0,750
1,00	1,00	0,720
1,00	5,00	0,750
1,00	10,00	0,768
1,00	10,00	0,732
1,00	10,00	0,750

Aus dieser Tabelle ergibt sich, dass sich die Löslichkeit des Natriumglykocholates in Äther auch in Anwesenheit des Cholesterins nicht verändert.

### III. PETTENKOFERSCHIE REAKTION DES BILIRUBINS UND DIE EXTRAHIERBARKEIT DES BILIRUBINS MIT ÄTHER.

Nach meiner Betrachtung zeigt auch das Bilirubin (Dr. D. Grübler & Co. Leipzig) positive Pettenkofersehe Reaktion. Dabei bleibt es aber dahingestellt, ob diese positive Pettenkofersehe Reaktion wirklich von Bilirubin selbst oder von anderen, im

Bilirubin (Grübler) beigemischten Substanzen verursacht würde. Jedenfalls ist es sehr wichtig zu sehen, ob das Bilirubin auch nach der Extraktion mit Äther die positive Pettenkofersehe Reaktion zeigt.

Eine kleine Menge von Bilirubin (Grübler) wurde in 50,0 ccm Chloroform gelöst, davon 0,5 ccm aufgenommen und dann das Chloroform verdunstet. Der Rückstand wurde in 2,0 ccm Alkohol gelöst. An 1,0 ccm dieser alkoholischen Lösung wurde der Bilirubingehalt nach van den Bergh bestimmt. Er betrug 0,00525 mg. Daraus ergab sich, dass die ursprüngliche Menge des im Chloroform gelösten Bilirubins 1,05 mg (2,1 mg/dl) betrug. Je 0,5, 1,5, 5,0, 7,0 und 17,0 ccm dieser Bilirubinlösung wurde im Becherglas von 50 ccm auf einer elektrischen Heizplatte mit elektrischem Fächer schnell getrocknet. Einerseits wurde jeder Rückstand direkt in 2,0 ccm Alkohol gelöst, mit 0,2 ccm 1%iger Rohrzuckerlösung und 2,0 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt, 30 Sekunden lang geschüttelt, dann 1 Minute lang in Eiswasser gekühlt und schliesslich binnen 30 Minuten mit einer möglichst gleichfarbigen Standardlösung kolorimetrisch verglichen. Andererseits wurde jeder der obigen Bilirubinrückstände einigemal mit 2,0 ccm Äther extrahiert, und dann der mit Äther nicht extrahierbare Teil in 3,0 ccm Alkohol gelöst. Je 1,0 ccm dieser alkoholischen Lösungen wurde zuerst in ein Reagenzgläschen abpipettiert, und dann der Bilirubingehalt nach van den Bergh bestimmt.

An der übrigbleibenden alkoholischen Lösung wurde die von mir modifizierte Pettenkofersehe Reaktion geprüft. Die Resultate sind in Tabelle VIII zusammengestellt.

Aus der Tabelle stellt sich heraus, dass das Bilirubin im Gebiete von 0,0105 bis 0,357 mg nach der zwei- bzw. dreimaligen Extraktion mit 2,0 ccm Äther keine Pettenkofersehe Reaktion mehr zeigt, und dabei das Bilirubin selbst ungefähr um 80–90% sich vermindert. Wie diese Verminderung des Bilirubinwertes nach der Ätherextraktion erklärt werden könnte, bleibt vorläufig dahingestellt.

TABELLE VIII.

Ursprüngliche		Ätherextraktion		Zurückgebliebene	
van den Berghsche Reaktion mg	Pettenkofersche Reaktion mg	Menge des Äthers cem	Das wievielte Mal	van den Berghsche Reaktion mg	Pettenkofersche Reaktion mg
0,0105	(-)	2,0	2	(-)	(-)
0,0105	(-)	2,0	2	(-)	(-)
0,0315	0,060	2,0	2	(++)	(-)
				unmessbar	
0,0315	0,060	2,0	2	0,003750	(-)
0,1050	0,272	2,0	2	0,024975	(-)
0,1050	0,268	2,0	2	0,018000	(-)
0,1470	0,390	2,0	3	0,019500	(-)
0,3570	—	2,0	3	0,031875	(-)

## VI. DIE PETTENKOFERSCHE REAKTION DER FETTSÄUREN.

Es ist von grosser Wichtigkeit zu entscheiden, ob die Fettsäuren, wie Stearin-, Palmitin- und Oleinsäure, auch die positive Pettenkofersche Reaktion zeigen oder nicht, da sie bei den biologischen Untersuchungen nicht ausser Acht gelassen werden können. 2,0 cem einer 2,78%igen alkoholischen Stearinsäure (Takeda)-Lösung und dieselbe Menge einer 1,6%igen alkoholischen Palmitinsäure (Kahlbaum)-Lösung zeigten nicht die von mir modifizierte Pettenkofersche Reaktion. Dagegen ergibt schon eine verdünnte alkoholische Oleinsäure (Kahlbaum)-Lösung (0,15%) die positive Pettenkofersche Reaktion. Wenn man aber aus der Stärke der Reaktion die entsprechende Menge der Glykocholsäure berechnet, so beträgt die letztere nicht mehr als ein Zehntel der ursprünglichen Oleinsäure, was aus der Tabelle IX leicht ersichtlich ist.

Nun wurde die bekannte Menge (3-6 mg) der Oleinsäure mit je 2,0 cem Äther dreimal extrahiert. Der in Äther nicht übergehende Rückstand wurde in 2,0 cem Alkohol gelöst, dann mit 0,2 cem einer 1%igen Rohrzuckerlösung und 2,0 cem Schwefelsäure (konz.) versetzt und 30 Minuten lang geschüttelt. Dabei fiel die



TABELLE IX.

Oleinsäure in 2,0 cem Alkohol mg	Glykocholsäuremenge in Standardlösung in mg Die Skala steht immer auf 15 mm.	Gefundene Werte	
		Skala mm	mg als Glykocholsäure
6,0	0,4	10,5	0,57
6,0	0,4	10,0	0,60
3,0	0,2	11,0	0,27

modifizierte Pettenkofer'sche Reaktion negativ aus. Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die Oleinsäure eine viel schwächere Pettenkofer'sche Reaktion als die Glykocholsäure zeigt und mit Äther vollständig extrahiert werden kann.

#### V. VERSUCHE MIT BLUTSERUM.

##### A. Über die Behandlung des Blutserums mit Alkohol.

Die Gallensäuren und ihre Alkalisalze sind in kaltem Alkohol sehr leicht löslich. Wenn man also das Blutserum mit Alkohol behandelt, so müssen ein grosser Teil der Gallensäuren bzw. ihrer Alkalisalze und ausserdem verschiedene andere alkohollösliche Substanzen, die im Blutserum enthalten sind, in die alkoholische Lösung übergehen. Dabei muss man sich im voraus darüber klar sein, mit welcher Menge von Alkohol die Gallensäuren und ihre Salze aus dem Blutserum quantitativ extrahiert werden können.

1,0 cem Blutserum wurde langsam unter Schütteln in 25 cem Alkohol tropfenweise hineingetan und filtriert. Der Niederschlag wurde 3mal mit 5 cem Alkohol nachgewaschen. Schliesslich wurde er zum vierten Mal noch einmal mit 5 cem Alkohol nachgewaschen. 2,0 cem von diesem letzten Waschalkohol wurden mit 0,2 cem einer 1% igen Rohrzuckerlösung und 2,0 cem konzentrierter Schwefelsäure versetzt und geschüttelt; dabei fiel die Pettenkofer'sche Reaktion immer negativ aus. Aus solchen Experimenten konnte ich also konstatieren, dass die Gallensäuren resp. ihre Salze aus 1,0 cem Blutserum durch Extraktion mit 25 cem Alkohol und durch nachfolgendes dreimaliges Nachwaschen des Niederschlages mit 5 cem Alkohol quantitativ ausgezogen werden können.

*B. Über die notwendige und ausreichende Menge Äther, die das Cholesterin bzw. seine Ester und andere Pettenkofersehe Reaktion gebende Substanzen, welche aus dem Blutserum in die alkoholische Lösung übergehen müssen, fast vollständig von den Gallensäuren resp. ihren Salzen trennen kann.*

Ein zu untersuchendes Blutserum wurde in mehrere Portionen von je 1,0 ccm geteilt. Jede Portion wurde unter Schütteln in 25 ccm Alkohol gebracht und dann filtriert. Der Niederschlag wurde 3mal mit 5 ccm Alkohol nachgewaschen. Die alkoholische Lösung wurde in einem Becher von 50 ccm auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell verdampft. Der Rückstand wurde verschiedenemal mit 2,0 bis 4,0 ccm Äther extrahiert, um andere Pettenkofersehe Reaktion gebende Substanzen zu beseitigen. Der in Äther nicht übergehende Teil wurde in 3,0 ccm Alkohol gelöst; und an 2,0 ccm dieser alkoholischen Lösung wurden die Gallensäuren bzw. ihre Salze mittels der von mir modifizierten Pettenkofersehen Reaktion kolorimetrisch bestimmt.

Die Resultate sind in Tabelle X zusammengestellt.

TABELLE X.

Ver- suchs- nummer	Menge des Blutserums ccm	Menge des Äthers, welche zur einmalig. Extraktion gebraucht wurde (ccm)	Das wievielte Mal der Äther- extraktion	Gefundene Petten- kofersehe Werte mg
1.	1,0	2,0	1	0,450
	1,0	2,0	2	0,105
	1,0	2,0	3	0,105
	1,0	4,0	1	0,195
2.	1,0	2,0	2	0,108
	1,0	2,0	3	0,105
	1,0	4,0	1	0,150
	1,0	4,0	2	0,108
3.	1,0	2,0	1	0,376
	1,0	2,0	2	0,078
	1,0	2,0	3	0,078
4.	1,0	2,0	1	0,366
	1,0	2,0	2	0,082
	1,0	2,0	3	0,082

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass zu unserem Zwecke die Extraktion mit  $3 \times 2$  cem Äther ausreicht, insofern 1,0 cem von normalem Blutserum in Betracht kommt. Ob diese Manipulation auch in solchen Fällen, in welchen der Gehalt des Blutserums an Pettenkofer'sche Reaktion gebenden Substanzen, wie Cholesterin, Fettsäure etc., stark gesteigert ist, auch unverändert brauchbar ist, wird weiter untersucht werden.

### C. Zusatzversuche mit Cholesterin.

Das Cholesterin und seine Ester sind weder in Wasser, noch in physiologischer Kochsalzlösung, noch im Blutserum löslich. So konnte ich Zusatzversuche mit diesen Substanzen im eigentlichen Sinne nicht ausführen. Ich musste mich auf die folgenden Versuche beschränken.

1,0 cem Blutserum wurde tropfenweise unter Schütteln in 25 cem Alkohol getan und mit einer bestimmten Menge von Cholesterin (Merk) versetzt, welches in 1,0 cem Alkohol gelöst war. Nach Durchschütteln wurde die alkoholische Lösung filtriert und 3mal mit je 5 cem Alkohol nachgewaschen. Die alkoholische Lösung wurde auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell verdampft. Der Rückstand wurde 2 bis 3 mal mit je 2,0 cem Äther extrahiert. An dem mit Äther nicht extrahierbaren Rückstand wurden die Gallensäuren mittels der von mir modifizierten Pettenkofer'schen Probe kolorimetrisch bestimmt.

Die Resultate sind in Tabelle XI zusammengestellt.

Diese Tabelle zeigt auch, dass bei diesen Zusatzversuchen die Extraktion mit  $3 \times 2,0$  cem Äther ausreichend ist.

### D. Zusatzversuche mit oleinsaurem Natrium.

0,5 cem einer in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Natriumoleat (Kahlbaum)-Lösung und 0,5 cem physiologische Kochsalzlösung wurden zu 4,0 cem Blutserum zugefügt und durchgemischt. 1,0 cem dieser Mischung wurde unter Schütteln in 25 cem Alkohol getan, dann filtriert und 3mal mit je 5 cem



TABELLE XI.

Versuchs- nummer	Gallensäuren im Blutserum ohne Chole- sterinzusatz mg/dl	Zugesetzte Menge des Cholesterins mg/dl	Das wievielte Mal der Ätherextraktion	Gallensäuren im Blutserum mit Chole- sterinzusatz mg/dl
1.	7,4	80,0	2	7,4
		80,0	2	7,5
		80,0	2	7,4
		80,0	2	7,5
2.	11,6	80,0	2	11,8
3.	10,2	200,0	2	10,6
4.	7,4	500,0	2	8,9
5.	7,4	500,0	3	7,4
6.	8,5	1000,0	2	23,0
7.	6,8	1000,0	3	6,8
8.	6,3	500,0	3	6,3
		500,0	3	6,7
		1000,0	3	6,3
		1000,0	3	6,3
9.	7,6	500,0	2	9,8
		500,0	3	7,4
		1000,0	2	24,3
		1000,0	3	7,6

Alkohol nachgewaschen. Die weitere Prozedur war die gleiche wie bei den Zusatzversuchen mit Cholesterin. Die Resultate sind mit anderen Versuchen in Tabelle XIV zusammengestellt und werden später diskutiert werden.

*E. Wie viel wird von dem zum Blutserum zugesetzten Natriumglykocholat durch die unter V. B, C und D beschriebene Manipulation zurückgewonnen.*

4,5 ccm Blutserum wurden mit einer bestimmten Menge von Natriumglykocholat versetzt, das in 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst war, und gut durchgemischt. 1,0 ccm dieser Mischung wurde in 25 ccm Alkohol getan und weiter gleich wie oben unter V. B behandelt. Als Kontrollversuch wurden 4,5 ccm Blutserum mit 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die kein Glykocholat enthielt, versetzt und weiter ganz in gleicher Weise

Die Resultate sind in Tabelle XII zusammengestellt.

TABELLE XII.

Versuchs- material	Ver- suchs- nummer	Gallen- säuren im Blutserum mg/dl	Zugesetzte Glykochol- säure mg/dl	Erwartete Menge der Gallensäuren mg/dl	Gefundene Menge der Gallensäuren mg/dl	Differenz %
Menschen- blutserum	1.	8,25	Kontrolle	7,33	7,25	-1,0
			3,75	11,08	10,50	-5,2
			7,50	14,83	15,00	+1,1
			15,00	22,33	22,50	+0,7
			30,00	37,33	33,33	-8,0
			60,00	67,33	66,66	-1,0
			150,00	157,33	163,63	+4,0
			Kontrolle	6,75	6,99	+3,5
	2.	7,50	3,75	10,50	10,50	0
			7,50	14,25	14,49	+1,7
			15,00	21,75	21,00	-3,4
			30,00	36,75	34,61	-5,8
			60,00	66,75	66,66	-0,1
			150,00	156,75	156,52	-0,1
	3.	7,50	Kontrolle	6,75	6,75	0
			3,75	10,50	9,75	-7,1
			7,50	14,25	15,00	+5,3
			15,00	21,75	22,50	+3,4
			30,00	36,75	36,00	-2,0
			60,00	66,75	69,23	+3,7
			150,00	156,75	156,52	-0,1
			Kontrolle	6,75	6,90	+2,2
			3,75	10,50	10,50	0
			7,50	14,25	14,29	+1,7
			15,00	21,75	21,00	-3,4
			30,00	36,75	36,00	-2,0
			60,00	66,75	66,66	-0,1
			150,00	156,75	163,63	+4,4
Hunde- blutserum	4.	7,50	Kontrolle	6,75	6,75	0
			3,75	10,50	9,75	-7,1
			7,50	14,25	15,00	+5,3
			15,00	21,75	22,50	+3,4
			30,00	36,75	36,00	-2,0
			60,00	66,75	69,23	+3,7
			150,00	156,75	156,52	-0,1
			Kontrolle	6,75	6,90	+2,2
			3,75	10,50	10,50	0
			7,50	14,25	14,29	+1,7
			15,00	21,75	21,00	-3,4
			30,00	36,75	36,00	-2,0
			60,00	66,75	66,66	-0,1
			150,00	156,75	163,63	+4,4

Der Glykocholsäuregehalt des zugesetzten Natriumglyko-  
cholates wurde wie unter II. D bestimmt.

Aus diesen Versuchen kann man schliessen, dass das zugesetzte Natriumglykocholat durch die oben genannte Prozedur nicht verloren geht.

*F. Zusatzversuche mit Natriumglykocholat und gleichzeitig mit Cholesterin.*

Dass die Löslichkeit einer Substanz sich in Anwesenheit anderer Substanzen verändern kann, ist eine wohlbekannte Tatsache. Nun sind die Gallensäuren und ihre Salze nicht löslich in Äther. Ob diese Eigenschaft auch in Anwesenheit einer grossen Menge von Cholesterin bzw. Fettsäuren unverändert bestehen bleibt, muss genau untersucht werden, da die Zunahme der Blutgallensäuren oft von einer Zunahme der letztgenannten Substanzen begleitet werden kann.

4,5 ccm Blutserum wurden mit einer bestimmten Menge von Natriumglykocholat (Merck) versetzt, die in 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst war. 1,0 ccm dieser Mischung wurde in 25 ccm Alkohol hineingetan, mit einer bestimmten Menge von Cholesterin (Merck), welches in 1,0 ccm Alkohol gelöst war, versetzt, durchgeschüttelt und filtriert. Der Rückstand wurde mit je 5 ccm Alkohol 3mal nachgewaschen. Das Filtrat wurde auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell eingedampft. Der Rückstand wurde dreimal mit je 2,0 ccm Äther extrahiert. Der in Äther nicht übergehende Rückstand wurde in 3,0 ccm Alkohol gelöst. An 2,0 ccm dieser alkoholischen Lösung wurde die kolorimetrische Bestimmung der Gallensäuren auf die oben beschriebene Weise ausgeführt. Die gefärbte Lösung wurde mit der Standardlösung kolorimetrisch verglichen. Die Kontrollversuche wurden wie bei V. E angestellt.

Die Resultate sind in Tabelle XIII zusammengestellt.

Der Glykocholsäuregehalt des zugesetzten Natriumglykocholates wurde wie unter II. D bestimmt.

Aus der Tabelle ergibt sich, dass die Gallensäuren auch bei Vorhandensein einer grossen Menge von Cholesterin nicht in Äther übergehen.



TABELLE XIII.

Versuchsnummer	Gallensäuren in Kontrollversuchen mg/dl	Zugesetzte Menge		Erwartete Menge der Gallensäuren mg/dl	Gefundene Menge der Gallensäuren mg/dl
		des Cholesterins mg/dl	der Glykocholsäure mg/dl		
1.	5,8	80,0	3,30	9,10	8,3
		80,0	6,75	12,55	11,2
		80,0	14,85	27,65	18,9
2.	7,4	80,0	3,30	10,70	9,0
		500,0	3,30	10,70	9,1
		1000,0	3,30	10,70	9,0
3.	8,5	100,0	28,80	37,30	37,0
		100,0	57,60	66,10	66,5
		1000,0	57,60	66,10	66,5

*G. Zusatzversuche mit Natriumglykocholat und gleichzeitig mit Natriumoleat.*

4,0 ccm Blutserum wurden mit 0,5 ccm einer in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Natriumoleat(Kahlbaum)-Lösung und 0,5 ccm einer in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Natriumglykocholat (Merck)-Lösung versetzt und durchgeschüttelt. 1,0 ccm dieser Mischung wurde unter Schütteln in 25 ccm Alkohol getan, dann filtriert und dreimal mit je 5 ccm Alkohol nachgewaschen. Die weitere Prozedur wurde ganz gleich wie oben unter V. B. ausgeführt. Als Kontrollversuch wurden 4,0 ccm Blutserum mit 1,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die weder Glykocholat noch Oleat enthielt, versetzt und weiter in ganz gleicher Weise wie beim Hauptversuch behandelt. Der Glykocholsäuregehalt des zugesetzten Natriumglykocholates wurde wie unter II. D. bestimmt.

Die Resultate sind in Tabelle XIV zusammengestellt.

Aus dieser Versuchsreihe stellt sich heraus, dass die Gallensäuren, die im Blutserum bis zu 300,0 mg/dl enthalten sind, mit 25,0 ccm Alkohol quantitativ ausgezogen werden können, und dass weiter das Vorhandensein einer grossen Menge(bis zu 600,0 mg/dl) von Oleinsäure keinen besonderen Einfluss auf die Endresultate ausübt.

TABELLE XIV.

Gallen- säuren im Blutserum mg/dl	Zugesetzte Menge		Erwartete Menge der Gallen- säuren mg/dl	Gefundene Menge der Gallen- säuren mg/dl	Differenz %
	der Oleinsäure mg/dl	der Glykocholsäure mg/dl			
8,25	0	0	6,60	6,15	+ 6,8
	600,00	0	6,60	7,50	+ 13,6
	600,00	300,00	306,60	313,00	+ 2,1
	600,00	150,00	156,60	163,63	+ 4,4
	600,00	75,00	81,71	85,71	+ 5,0
	600,00	37,50	44,10	47,37	+ 7,4
	600,00	18,75	25,35	26,46	+ 3,4
	600,00	9,38	15,98	16,50	+ 3,1
	300,0	0	6,60	6,99	+ 5,9
	300,0	300,00	306,60	342,85	+ 11,8
	300,0	150,00	156,60	156,51	0
	300,0	75,00	81,60	90,00	+ 10,0
	300,0	37,50	44,10	45,00	+ 3,0
	300,0	18,75	25,35	24,00	- 5,3
	300,0	9,38	15,98	15,00	- 6,0

#### V. EINE NEUE BESTIMMUNGSMETHODE DER GALLENSÄUREN IM BLUTSERUM.

Unter Berücksichtigung der verschiedenen oben genannten Kontrollversuche schlage ich das folgende Verfahren zur Bestimmung der Gallensäuren im Blutserum vor:

1,0 ccm Blutserum wird unter Schütteln in 25 ccm Alkohol tropfenweise hineingetan, nach Durchschütteln 30 Minuten lang stehen gelassen und dann in einen Becher von 50 ccm filtriert. Der Niederschlag wird noch dreimal mit je 5 ccm Alkohol nachgewaschen. Die alkoholische Lösung wird auf elektrischer Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell eingedampft. Der trockne Rückstand wird dreimal mit 2 ccm Äther extrahiert, um Cholesterin und Fette zu beseitigen. Die in Äther suspendierten feinen Fragmente des Rückstandes werden durch Zentrifugieren zurückgewonnen. Der in Äther nicht mehr lösliche Rückstand

wird mit 3,0 ccm Alkohol extrahiert. Der Alkoholextrakt wird in den Zentrifugentubus hineingegossen, welcher zur obigen Zentrifugierung des Ätherextraktes gebraucht wurde, und wieder zentrifugiert. 2,0 ccm des klaren farblosen Zentrifugates werden in eine Eprouvette pipettiert, mit 0,2 ccm 1%iger Rohrzuckerlösung und 2,0 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Das Reagenzrohr wird 30 Sekunden lang geschüttelt, dann 1 Minute lang in Eiswasser gekühlt, um die weitere Farbenentwicklung zu verhindern, und weiter innerhalb 30 Minuten mit einer möglichst gleichfarbigen Vergleichslösung kolorimetrisch verglichen. Die Skala der Standardlösung steht immer auf 15,0 mm. Aus der Skala der zu untersuchenden Lösung wird die Menge der Gallensäuren (a), die in 2,0 ccm Zentrifugat enthalten ist, in Tabelle II gesucht. Nun ergibt sich der Gallensäuregehalt (g), als mg Glykocholsäure in 100,0 ccm Blutserum ausgedrückt (mg/dl), aus der folgenden Formel:

$$g = a \cdot \frac{3 \cdot 100}{2} \text{ mg/dl}$$

Der Gallensäuregehalt in normalen Menschen- und Hundebutsera wurde mittels dieser Methode bestimmt. Dabei wurde die Blutentnahme immer im nüchternen Zustand ausgeführt.

Die Resultate sind in Tabelle XV zusammengestellt.

Aus der Tabelle ergibt sich, dass der Gallensäuregehalt in normalen Menschen- und Hundesera nach meiner eigenen Bestimmungsmethode 8,78 resp. 7,31 mg/dl im Mittel beträgt, indem die einzelnen Werte bei Menschensera zwischen 6,30 und 11,60 mg/dl und bei Hundebutsera zwischen 6,24 und 10,50 mg/dl schwanken.

## VI. ANWENDBARKEIT DIESER METHODE ZUR BESTIMMUNG DER GALLENSÄUREN IN DER LYPHPE.

Bei experimentellen Ikterusforschungen kommt sehr oft das Verhalten der Thoracicuslymphe in Betracht. Also ist es auch von grosser Bedeutung zu sehen, ob meine Bestimmungsmethode auch an der Lymphe anwendbar sei.

1,0 ccm Lymphe aus Ductus thoracicus-Fistel von normalem



TABELLE XV.

Versuchs- nummer	Gallensäuregehalt im normalen	
	Menschenblutserum mg/dl	Hundeblutserum mg/dl
1.	6,30	6,24
2.	6,40	6,24
3.	6,80	6,45
4.	7,02	6,45
5.	7,40	6,75
6.	7,54	6,75
7.	7,60	6,75
8.	7,80	6,75
9.	7,80	6,75
10.	8,20	6,75
11.	8,50	6,75
12.	9,62	6,75
13.	9,62	6,88
14.	9,75	6,99
15.	9,75	6,99
16.	10,20	7,20
17.	10,30	7,25
18.	10,50	7,28
19.	10,80	7,50
20.	11,05	7,50
21.	11,60	7,50
22.		7,50
23.		7,50
24.		9,75
25.		10,50
26.		10,50
Mittelwert	8,78	7,31

Hunde wurde in 25 ccm Alkohol tropfenweise hineingetan, durchgeschüttelt und dann filtriert. Der Niederschlag wurde noch dreimal mit je 5 ccm Alkohol nachgewaschen. Die alkoholische Lösung wurde auf einer elektrischen Heizplatte mit einem elektrischen Fächer schnell eingedampft. Die weitere Behandlung

wurde ganz in derselben Weise ausgeführt wie beim Blutserum.

Die Resultate sind in Tabelle XVI zusammengestellt.

TABELLE XVI.

Versuchs- nummer	Gallensäuregehalt in der Lymphe aus Ductus thoracicus- Fistel vom Hunde mg/dl
1.	6,40
2.	6,49
3.	6,99
4.	6,99
5.	7,50
6.	7,50
7.	8,35
8.	8,70
Mittelwert	7,35

Nun kommen die Zusatzversuche in Betracht. 4,5 ccm Thoracicusfistellymphe wurden mit einer bestimmten Menge von Natriumglykocholat versetzt, die in 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst war, und durchgemischt. 1,0 ccm dieser Mischung wurde in 25 ccm Alkohol getan und ceteris paribus ganz gleich behandelt. Als Kontrollversuch wurden 4,5 ccm Lymphe mit 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die kein Glykocholat enthielt, versetzt und weiter in ganz gleicher Weise behandelt.

Die Resultate sind in Tabelle XVII zusammengestellt.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, dass das zugesetzte Natriumglykocholat fast in der ursprünglichen Menge wiedergefunden wird. So ist diese Methode auch zur Bestimmung der Gallensäuren in der Lymphe brauchbar.

Über die Anwendbarkeit zur Bestimmung der Gallensäuren in der Galle sind weitere Untersuchungen im hiesigen Laboratorium im Gang.

TABELLE XVII.

Versuchs- nummer	Gallensäuren in der Hundelymphe mg/dl	Zugesetzte Glykochol- säure mg/dl	Erwartete Menge der Gallensäuren mg/dl	Gefundene Menge der Gallensäuren mg/dl	Differenz %
1.	8,25	Kontrolle	7,33	7,50	+ 2,3
		3,75	11,08	9,75	- 12,0
		7,50	14,83	14,25	- 3,9
		15,00	22,33	24,00	+ 2,4
		30,00	37,33	37,50	+ 0,5
		60,00	67,33	69,20	+ 2,8
		150,00	157,33	163,63	+ 4,0
		300,00	307,33	314,00	+ 2,1
2.	8,70	Kontrolle	7,83	7,50	- 4,2
		3,75	11,58	10,50	- 9,3
		7,50	15,33	15,00	- 2,2
		15,00	22,83	22,90	+ 0,6
		30,00	37,83	40,90	+ 8,1
		60,00	67,83	69,23	+ 2,1
		150,00	157,83	156,52	- 0,8
		300,00	307,83	327,32	+ 6,3

## ZUSAMMENFASSUNG.

1. Hier wird eine neue quantitative Bestimmungsmethode der Gallensäuren im Blutserum, welche auf der von mir modifizierten Pettenkoferschen Probe beruht, in Vorschlag gebracht.

2. Diese Methode ist auch zur Bestimmung der Gallensäuren in der Lymphe anwendbar.

## LITERATUR.

- Aldrich, M. und Bledsoe, S. (1928): J. of biol. Chem., **77**, 519.  
 Charlet, M. (1929): Biochem. Z., **210**, 42.  
 Kusui, K. (1932): J. of Biochem., **15**, 399.  
 Mylius (1887): Z. f. physiol. Chem., **11**, 492.  
 Udránszky, L. (188): Z. f. physiol. Chem., **12**, 355, 377.



## EINFLUSS DER MILZ AUF DIE GALLEN- UND GALLENSÄUREAUSSCHIEDUNG.

VON

TOSHIYUKI TANAKA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut, Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 18. Juli 1933)

Seit der Untersuchung von Dubois (1917) ist allgemein anerkannt, dass die Milz eine hormonale Wirkung hat, und dass ihre Funktion mit dem Eisen-, Calcium- und Kohlenhydratstoffwechsel in innigem Zusammenhang steht. Ausserdem ist seit der Untersuchung von Bernet (1922) bekannt, dass die Funktion der Milz mit dem Eiweissstoffwechsel, und nach Oda (1932) dass sie mit dem Cholesterinstoffwechsel eng verknüpft ist.

Neuerdings wurde von Fuziwara (1932, 1933) und Tateishi (1933) gefunden, dass der durch Splenektomie gestörte Kohlenhydratstoffwechsel bis zu einem gewissen Grade normal wiederhergestellt wird durch Zufuhr von Gallensäure, die bekanntlich in der Leber gebildet wird, und deren Ausscheidung aus der Leber durch die Wirkung eines Hormons, dessen Sekretion von der Funktion des vegetativen Nervensystems abhängig ist, beeinflusst wird.

Seit Misaki (1927) wurde von vielen Autoren bewiesen, dass die Gallensäure eine hormonale Wirkung hat, indem sie im Stoffwechsel bzw. im Kohlenhydratstoffwechsel eine grosse Rolle spielt. Milz und Leber stehen also in unverkennbarer Beziehung zueinander.

Im oben erwähnten Sinne habe ich den Einfluss der Splenektomie auf die Gallen- sowie Gallensäureausscheidung untersucht. Was den Einfluss der Splenektomie auf die Gallenausscheidung betrifft, so wurde schon früher von Pugliese (1899) beobachtet, dass die Splenektomie die Gallensekretion aus der Gallenblasenfistel des Hundes vermehrt.

Die Beziehung zwischen Gallensekretion und vegetativem

Nervensystem wurde bereits von vielen Autoren wie Eiger (1916), Alpern (1923), Adachi (1923), Takano (1927), Makino (1932) u. Okamura (1928–1930) untersucht, und es wurde gefunden, dass der vagische Nerv die Gallensekretion fördert, der sympathische dagegen sie hemmt, indem die beiden Nerven für die Gallensekretion gegeneinander antagonistisch wirken.

Nach Okamura (1928/30) soll die Gallen- und Gallensäureausscheidung aus der Gallenblasenfistel des Hundes durch Zufuhr von Atropin, welches auf den vagischen Nerv lähmend wirkt, vermindert werden. Weiter wurde von Ito (1932) und Tanaka (1933) beobachtet, dass die linke Splanchnikotomie des Hundes die Gallen- und Gallensäureausscheidung aus der Gallenblasenfistel stark vermehrt. Dies weist darauf hin, dass die Gallensäureausscheidung aus der Leber durch die Funktion des Vagus gefördert, aber durch die des Sympathicus gehemmt werden dürfte.

Wenn die durch Splenektomie beeinflusste Gallen- und Gallensäureausscheidung durch das Fehlen des Hormons verursacht werden könnte, so müsste sie durch das vegetative Gift verändert werden. So habe ich denn den Einfluss des Atropins auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung aus der Gallenblasenfistel des splenektomierten Hundes untersucht.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Kräftigen Hunden wurden eine permanente Gallenblasenfistel nach Bickel angelegt. Nachdem sich die Tiere von der Operationswunde erholt hatten, wurden sie jeweils um 3 Uhr nachmittags mit einer bestimmten Nahrung, die aus Reis, Fischchen, Gemüse, Sojasuppe und Wasser bestand, gefüttert.

Die Galle wurde von 9 Uhr morgens bis 3 Uhr nachmittags 6 Stunden lang in eine Glaskugel gesammelt, während man ausserhalb dieser Zeit die Hunde ruhig ihre eigene Galle ablecken liess. Aus der gesammelten Galle wurde die Taurocholsäure gasometrisch nach Foster u. Hooper (1919) bestimmt.

Nach diesem eine Woche dauernden Versuch wurde die Splenektomie des Hundes ausgeführt, von der sich die Hunde erst

3–4 Tage nach der Operation erholten. Dann wurde die Galle 6 Stunden lang, wie zuvor, gesammelt und der Gallensäuregehalt bestimmt. Der Versuch wurde in drei Perioden: Vor-, Nach- und Versuchsperiode, geteilt. In der Versuchsperiode wurde den Hunden anderthalb Stunden vor der Gallensammlung die ganze Menge Milzextrakt eines Hundes subcutan verabreicht; die Gallensäuremenge der 6-stündigen Galle in den drei Perioden wurde verglichen.

Nach Beendigung dieses Versuches liess man die Hunde einige Tage bis zum nächsten Versuch zur Ruhe kommen. In der nächsten Versuchsperiode wurden dann, ebenfalls anderthalb Stunden vor der Gallensammlung, 2,0 ccm einer 0,05%igen Atropinsulfatlösung (1,0 mg) subcutan gegeben, und der Gallensäuregehalt in den drei Perioden verglichen.

Der Milzextrakt wurde nach Fuziwara (1933) bereitet. Auf diese Weise wurde der Einfluss der Splenektomie, des Milzextraktes und des Atropins auf die Gallen- sowie Gallensäureausscheidung untersucht. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–IV zusammengestellt.

Aus den Tabellen I–IV lässt sich ersehen, dass die Gallensäuremenge in 6-stündiger Galle sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual im allgemeinen durch die Splenektomie vermehrt wird, und dass diese Vermehrung der absoluten Menge nach im ersten Versuch 19,66–54,05% und im zweiten Versuch 21,72–40,81% beträgt.

Die 6-stündige Gallenmenge des splenektomierten Hundes wird im allgemeinen vermehrt, und zwar im Vergleich zu der vor der Splenektomie im ersten Versuch durchschnittlich um 4,29–48,81% und im zweiten durchschnittlich um 3,48–33,78%.

Die Gallensäurebildung in der Leber wird also durch Milzexstirpation gesteigert, was eine vermehrte Gallensekretion zur Folge hat.

Was den Einfluss des Milzextraktes betrifft, so wurde gefunden, dass die Zufuhr des Milzextraktes bei splenektomierten Hunden die Gallen- sowie Gallensäureausscheidung vermindert, und dass diese Verminderung der Gallensekretion im Vergleich zu der Gallen-

TABELLE I.  
Hund A. (K.G. 12,0 kg)

11./10. Gallenblasen fistel-Operation					
Datum	Gallen- menge ccm	Spez. Gewicht	Taurocholsäure in 6 Stunden		Bemerkungen
			mg	%	
27/10	38	1020	634,89	1,670	
28/ „	40	1020	731,46	1,828	
29/ „	38	1020	672,71	1,770	
30/ „	36	1020	566,96	1,574	
31/ „	41	1017	620,20	1,512	
1/11	36	1017	621,30	1,726	
2/ „	33	1018	467,81	1,417	
Durch- schnittswert	37,4	1019	616,48	1,642	
12./11. Milzexstirpation					
16/11	40	1019	987,44	2,247	
17/ „	39	1021	1057,05	2,710	
18/ „	38	1020	894,50	2,355	
19/ „	33	1020	499,40	1,513	← Milzextrakt
20/ „	38	1018	548,23	1,442	
21/ „	43	1019	810,04	1,884	
22/ „	29	1023	1035,02	3,569	
1/12	40	1020	995,85	2,489	
2/ „	40	1020	909,19	2,273	
3/ „	36	1020	699,15	1,942	
4/ „	36	1018	528,77	1,463	← Atropin sulf.
5/ „	39	1020	670,14	1,718	
6/ „	30	1023	722,65	2,409	
7/ „	28	1025	743,21	2,654	



TABELLE II.

Hund B. (K.G. 14,0 kg)

## 10./10. Gallenblasenfistel-Operation

Datum	Gallen- menge ccm	Spez. Gewicht	Taurocholsäure in 6 Stunden		Bemerkungen
			mg	%	
27/10	41	1020	873,20	2,130	
28/ „	36	1020	724,49	2,013	
29/ „	39	1019	869,16	2,229	
30/ „	32	1021	854,47	2,670	
31/ „	36	1022	768,18	2,134	
1/11	40	1021	907,60	2,269	
2/ „	39	1018	960,88	2,464	
Durch- schnittswert	37,6	1020	851,14	2,273	

## 17./11. Milzexstirpation

24/11	45	1018	1045,17	2,323	
25/ „	51	1018	1088,01	2,133	
26/ „	47	1018	1102,70	2,346	
27/ „	50	1017	912,49	1,825	← Milzextrakt
28/ „	46	1018	1067,45	2,321	
29/ „	48	1019	1117,39	2,328	
30/ „	53	1018	1263,17	2,383	
8/12	55	1019	1173,57	2,134	
9/ „	48	1019	1067,45	2,224	
10/ „	48	1020	1099,52	2,291	
11/ „	50	1019	945,17	1,890	← Atropin sulf.
12/ „	50	1020	971,24	1,942	
13/ „	50	1020	1085,08	2,170	
14/ „	52	1020	1056,21	2,031	

TABELLE III.  
Hund C. (K.G. 12,0 kg)

12./10. Gallenblasenfistel-Operation					
Datum	Gallen- menge ccm	Spez. Gewicht	Taurocholsäure in 6 Stunden		Bemerkungen
			mg	%	
27/10	19	1035	692,91	3,647	
28/ „	14	1034	520,32	3,717	
29/ „	16	1036	612,86	3,830	
30/ „	15	1035	669,41	4,463	
31/ „	18	1030	689,26	3,829	
1/11	17	1033	702,19	4,131	
2/ „	16	1035	653,86	4,087	
Durch- schnittswert	16,4	1034	648,69	3,958	
18./11. Milzexstirpation					
24/11	25	1030	811,51	3,246	
25/ „	15	1033	762,34	5,082	
26/ „	16	1039	796,82	4,980	
27/ „	18	1030	559,25	3,107	← Milzextrakt
28/ „	Die Nahrung wurde verwechselt; daher wurde die Untersuchung unterbrochen.				
29/ „					
30/ „					
4/12	21	1034	775,89	3,695	
5/ „	21	1034	747,74	3,561	
6/ „	23	1030	845,17	3,675	
7/ „	18	1036	573,93	3,189	← Atropin sulf.
8/ „	22	1030	825,59	3,753	
9/ „	20	1034	765,37	3,827	
10/ „	20	1030	848,40	4,242	

TABELLE IV.  
Hund D. (K.G. 12,0 kg)

31./10. Gallenblasenfistel-Operation					
Datum	Gallen- menge ccm	Spez. Gewicht	Taurocholsäure in 6 Stunden		Bemerkungen
			mg	%	
17/11	53	1018	872,22	1,645	
18/ „	45	1020	765,86	1,702	
19/ „	55	1018	778,71	1,416	
20/ „	59	1018	686,54	1,164	
21/ „	52	1019	762,43	1,466	
22/ „	39	1021	738,20	1,893	
23/ „	50	1017	694,01	1,388	
Durch- schnittswert	50,4	1019	756,85	1,525	
27./11. Milzexstirpation					
1/12	70	1018	966,96	1,381	
2/ „	78	1016	915,64	1,174	
3/ „	77	1015	834,29	1,084	
4/ „	73	1015	592,29	0,811	← Milzextrakt
5/ „	72	1017	817,02	1,135	
6/ „	71	1015	803,07	1,131	
7/ „	72	1014	856,68	1,189	
8/ „	62	1016	688,75	1,111	← Atropin sulf.
9/ „	76	1015	817,75	1,076	
10/ „	62	1016	771,85	1,245	
11/ „	64	1016	765,98	1,197	

menge der Vorperiode im allgemeinen vermindert wird; ferner dass die Verminderung der Gallensäuremenge der absoluten Menge nach 15,40–47,41% und prozentual 19,49–37,92% beträgt, wie in den Tabellen I–IV angegeben ist.

Der Milzextrakt wirkt also auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung hemmend, indem die durch Splenektomie vermehrte

Gallen- sowie Gallensäureausscheidung durch Zufuhr von Milzextrakt wieder zur Norm gebracht wird.

Was die Wirkung von Atropin auf die Gallen- sowie Gallensäureausscheidung anbelangt, so wird in den Tabellen I–IV gezeigt, dass die durch Splenektomie vermehrte Gallen- und Gallensäureausscheidung durch Zufuhr von Atropin wieder auf den Wert vor der Splenektomie zurückgeführt wird.

Die Gallen- und Gallensäureausscheidung des splenektomierten Hundes wird also durch Zufuhr von vegetativem Gift, Atropin, vermindert, und diese Verminderung der Galle beträgt im Vergleich zu der Gallenmenge der Vorperiode 0,6–17,33%, die der Gallensäuremenge der absoluten Menge nach 14,86–39,09% und prozentual 8,41–34,32%.

Durch diesen Versuch wurde festgestellt, dass die Gallen- sowie Gallensäureausscheidung in der Leber des Hundes durch Splenektomie gesteigert, und dass diese Steigerung durch Zufuhr von Milzextrakt od. Atropin wieder zur Norm gebracht, bzw. durch letzteres subnormal herabgesetzt wird. Aus diesen Daten scheint mir hervorzugehen, dass die Leber des Hundes durch Milzexstirpation in einen vagotonischen Zustand versetzt wird, und dass die Milz ein den Vagus lähmendes Hormon enthält, welches die Gallensäurebildung der Leber hemmend beeinflusst.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Splenektomie vermehrt die Gallensäureausscheidung aus der Leber deutlich, und im allgemeinen auch die Gallensekretion.

2. Diese vermehrte Gallen- sowie Gallensäureausscheidung wird durch Zufuhr von eigenem Milzextrakt oder von Atropin wieder zur Norm zurückgeführt.

Aus den Daten geht hervor, dass die Milz auf die Gallen- sowie Gallensäureausscheidung in der Leber eine hormonale Wirkung ausübt.

#### LITERATUR.

Adachi, A. (1923): *Bioch. Zschr.*, **140**, 185.



- Aplern, D. (1923): Bioch. Zschr., **137**, 507.  
Bernet, E. (1922): „ **128**, 258.  
Dubois, M. (1917): „ **82**, 141.  
Eiger, M. (1916): Zschr. f. Biolog., **66**, 229.  
Fujiwara, K. (1932): Bioch. Zschr., **256**, 384.  
(1933): „ **259**, 203.  
Ito, T. (1932): „ **254**, 50.  
Makino, M. (1932): Chiba Igakkai Zasshi: **10**, 217 u. 355 (Japanisch).  
Misaki, K. (1927): Jl. of Bioch., **8**, 235.  
Oda, K. (1932): Okayama Igakkai Zasshi: **44** Jg. 1916 u. 2051.  
(Japanisch).  
Okamura, T. (1928/30): Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 387. u. 400.  
Pugliese, A. (1899): Arch. f. Anat. u. Physiol., **1899** Jg. 60.  
Takano, R. (1927): Jl. of Gastroenterolog., **1**, 1165. (Japanisch).  
Tanaka, T. (1933): Jl. of Bioch., **18**, 19.  
Tateishi, C. (1933): Noch nicht veröffentlicht.



## STUDIES ON THE DIAZO-BODY IN TYPHOID URINE.

By

MASAKI MIYAZAKI.

*(From the Internal Clinic of Prof. M. Tsudji,  
Nagasaki Medical College.)*

(Received for publication, July 20, 1933)

Since Ehrlich reported in (1882) that the urine of patients suffering from typhoid fever, measles or serious tuberculosis, etc. shows the diazo-reaction, it has been calling the attention of clinicians as a helping method of diagnosis or as an indicator of prognosis in these diseases. Now apart from the discussion about the nature of this reaction, if the reaction could be proved also in the blood, it would certainly be more valuable from the clinical point of view. According to Weiss, however, neither the various liquids in the body nor the extracts from various organs show the diazo-reaction. On the other hand, Leimdörfer and Charnass demonstrated that the deproteinised blood serum shows distinctly the diazo-reaction under alkaline reaction with liquor potassae, and its intensity depends upon the kinds of diseases. A few years ago K. Inoue at our internal clinic in his careful investigation could not prove the reaction, neither in the blood serum of healthy persons, nor in that of typhoid patients, by means of Ehrlich's original method. I also reinvestigated it with the same result, but could prove a fine reaction not only in the blood serum of typhoid patients, but also in that of healthy persons under alkaline reaction with liquor potassae. It is already known that several substances give the diazo-reaction in the chemical investigation. According to Leo Hermann's the substances in urine, which give the diazo-reaction, are different in various diseases. Although Weiss considered the kidney as the place forming diazo-body, it seems to me inconceivable that all these substances should be formed only in the kidney, so some of them must certainly

be formed in other parts of the body. If the diazo-reaction in the urine, which will be proved by Ehrlich's original method, depends upon diazo-bodies thus formed, they ought to appear in the blood, but strange to say, they could not be found in it

Bondzynski (1905) and his co-worker isolated the antoxy-proteinic acid as a normal component of human urine and found that it gives the diazo-reaction. But it was not known that the diazo-reaction in the pathologic urine is due to this substance until Y. Komori (1926) isolated a great amount of antoxyproteinic acid from the diazo-urine of tuberculosed patients. In the following year Y. Sendju in the same way isolated a great amount of antoxyproteinic acid from the typhoid urine with the diazo-reaction and considered it as the principal carrier of the diazo-reaction in the urine. Unexpectedly during the epidemic of typhoid fever at Nagasaki (1931) a chance was given to collect the typhoid urine with the diazo-reaction, and under the leading of Y. Sendju, 29 g of barium salt of antoxyproteinic acid, a minimal quantity of which gave an intensive diazo-reaction, was obtained from 80 l of the urine. Considering these results there is no doubt that the antoxyproteinic acid is at least one of the diazo-bodies in the urine of the sufferers from typhoid fever or tuberculosis. So far as the antoxyproteinic acid is a product of intermediate metabolism of protein, it must exist abundantly in the circulating blood of the typhoid patient whose urine shows the diazo-reaction, wherefore it must be proved to be in the blood by means of the diazo-reaction. But it could not be proved. Why could it not be proved to be in the blood? In answering this question, two probabilities may be considered, that is: the rapid excretion of it from the body, or its decomposition notwithstanding its appearance in the blood stream. To make this point clear, animal experiments and clinical investigations were undertaken as follows.

#### METHODS.

Rabbits were used in these experiments. From the barium salt of antoxyproteinic acid the barium was removed quantitatively by sulphuric acid. After the neutralisation of this watery solution



of antoxyproteinic acid with sodium carbonate, it was injected into ear veins of rabbits. Then, at definite intervals, 10 cc. of the blood at a time was drawn out from their cervical veins and the urine was catheterised. The blood was deproteinised with trichlor acetic acid. In the case of the urine, 10 cc. of it was treated with solution of subacetate of lead in order to decolorize it and the excess of the lead was removed by sulphurated hydrogen. Both liquids thus obtained were concentrated to 10 cc., under vacuum distillation and neutralized with sodium carbonate to test the diazo-reaction. And for the purpose of colorimetric determination of the antoxyproteinic acid in both materials, the colours which resulted when the diazo-reaction took place with the watery solution of 0.1% or 0.2% of the antoxyproteinic acid, were employed as the standard.

#### RESULT.

The result is shown in Table I. In the first case, the diazo-reaction in the blood was so weak that it was unmeasurable and the reaction in the urine was also very weak. So in the following cases larger quantities were injected. In the second case, the diazo-reaction in the blood which was drawn out soon after the injection was pretty distinct, but an hour later it was already negative and on the other side, only 0.012 gm, that is, 1.2% of the injected antoxyproteinic acid, was excreted into the urine in an hour and a half. In all the cases it was common that only a small part of the injected antoxyproteinic acid was excreted into the urine in spite of the rapid disappearance of it from the blood.

#### ON THE DIAZO-REACTION OF FAECES EXTRACT.

From the previous result, it was suggested that one part of the antoxyproteinic acid may be excreted by the digestive canal. To make this point clear the investigation on the faeces of typhoid patients whose urine was diazo-positive, and as control, of healthy persons or other patients, whose urines were diazo-negative, were undertaken as follows.

50 g of the faeces was boiled with a suitable quantity of water and filtrated. The filtrate was treated as in the case of the rabbits'

TABLE I.

No. of case	Sex	Weight	inject. quantity	time	at once	30'	60'	90'
				material				
1	♂	1820 g.	0.2 g.	{ blood urine	unmeas. weak	—	— unmeas. weak	—
2	♂	1730 g.	1.0 g.	{ blood urine	0.08%	—	—	— 0.012 g.
3	♂	2400 g.	2.0 g.	{ blood urine	0.12%	—	—	— 0.014 g.
4	♂	3150 g.	2.5 g.	{ blood urine	0.10%	0.07%	— 0.020 g.	—
5	♂	2540 g.	3.0 g.	{ blood urine	0.18%	0.12%	—	— unmeas. weak

urine to test the diazo-reaction. On the other hand, the intestinal contents of the rabbit which was killed an hour and a half after the injection of the antoxyproteinic acid were investigated in the same manner as in the case of the human faeces to find the diazo-reaction.

The results of these investigations are given in Table II and Table III. There the intensity of the diazo-reaction was shown by the concentration of watery solution of histidine chloride which gave the corresponding colour when the diazo-reaction took place. From Table II it appears that the faeces extract of typhoid patients whose urine was diazo-positive showed the diazo-reaction, but no relationship between the diazo-reaction of their faeces extract and that of their urine could be recognized; moreover the faeces extracts of healthy persons or other patients, whose urines were diazo-negative, showed also diazo-reactions of nearly the same intensity. On the other hand, as Table III shows, the intestinal contents of the normal rabbit which served as control gave also the diazo-reaction, and its intensity did not show a remarkable increase by the injection of the antoxyproteinic acid.

TABLE II.

No. of case	Name	Sex	Age	Diagnosis	D. R. of urine	D. R. of faeces extract
1	T. A.	♀	43	Typhus abdominalis.	##	0.20%
2	F. T.	♀	27	"	++	0.11%
3	T. T.	♂	45	"	++	0.09%
4	S. O.	♂	40	"	##	0.06%
5	T. K.	♂	20	"	##	0.05%
6	H. M.	♀	16	"	++	0.05%
7	T. M.	♀	33	"	##	0.03%
8	T. N.	♂	24	Infiltration of r. apex. Atony of stomach. Chr. intestinal catarrh.	—	0.13%
9	S. N.	♂	16	Pleuro-Peritonitis tuberculosa	—	0.08%
10	M. M.	♂	29	Infiltration of r. apex.	—	0.10%
11	K. S.	♂	28	Healthy	—	0.07%
12	M. I.	♂	21	"	—	0.07%

TABLE III.

No. of case	sex	weight	inject. quantity	D. R. of intest. cont.
1	♂	2500 g.	no inject.	0.12%
2	♂	2580 g.	no inject.	0.33%
3	♀	2460 g.	no inject.	0.20%
4	♂	2570 g.	1 g.	0.21%
5	♂	2420 g.	2 g.	0.08%
6	♀	2540 g.	3 g.	0.27%

## DISCUSSION.

In the animal experiment it appeared that the antoxyproteinic acid injected intravenously disappeared from the blood stream in a short time in spite of only a small part of it being excreted into the urine. Now, I must discuss the fate of the antoxyproteinic acid which disappeared from the blood stream without being excreted into the urine. For this question two possibilities can be

considered. One is the chemical decomposition in the body and the other is the excretion by the digestive canal. According to the clinical investigation, however, the faeces extract of the typhoid patients whose urine was diazo-positive showed the diazo-reaction, but also those of healthy persons or other patients, whose urines were diazo-negative, showed the diazo-reaction of nearly the same intensity. But considering the fact that not only no quantitative relationship between the diazo-reaction of the typhoid patients, urine and that of their faeces extract could be recognized, but also the faeces extracts of healthy persons or other patients, whose urines were diazo-negative, showed the diazo-reaction, the diazo-bodies in the faeces are probably not to be connected directly with the diazo-body in the typhoid urine, if the antoxyproteinic acid is considered as the principal carrier of the diazo-reaction in the typhoid urine. It is, therefore, highly probable that the greater part of the antoxyproteinic acid is rapidly decomposed in the living body, although a small part of it is excreted into the urine. From this conclusion the riddle why the blood of the typhoid patients whose urine is diazo-positive does not show the diazo-reaction is easily solved.

Although the nature of diazo-bodies in the faeces extract is unknown, their existence in the faeces is a very interesting new fact. One part of them, probably, may be ascribed to the products of decomposition of protein in the intestine, and the other part may be excreted with bile or intestinal juice; for the liver, according to the modern view, is considered as an excretory organ.

#### SUMMARY.

1. In the rabbit the greater part of the antoxyproteinic acid injected intravenously disappears in a short time from the blood stream without any considerable excretion from the body.
2. The faeces extract of the typhoid patients whose urine is diazo-positive shows the diazo-reaction, but those of healthy persons or other patients, whose urines are diazo-negative, show also the diazo-reaction of nearly the same intensity.



## REFERENCES.

- Bondzynski, (1905): H.S.'s Zeitschr. f. Physiol. Chem., **46**, 83.  
Ehrlich, P. (1882): Zeitschr. f. klin. Med., **5**, 139.  
Hermanns, L. (1926): Deutsch. Arch. f. klin. Med., **152**, 153.  
Leimdörfer, A. u. Charnass, D. (1923): Wien. klin. Wochenschr.,  
**36**, 393.  
Komori, Y. (1926): The Journ. of Biochem., **6**, 297.  
Sendju, Y. (1927): The Journ. of Biochem., **7**, 311.  
Wakamatsu, M. (1928): Nagasaki Igakkwai Zassi, **6**, 308.  
Weiss, M. (1922): Ergeb. d. inner. Med. u. Kinderheilk., **22**, 139.



## DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN EIWEISSSTOFFWECHSEL.

### II. Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber während der Winterzeit.

VON

HIROSHI MAKINO.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 24. Juli 1933)

Als stickstoffhaltige extraktive Stoffe wurden von verschiedenen Autoren (Smorodinzew 1912; Berlin 1924; Hiwatari 1927 u. Flössner 1929) zahlreiche Basen und Aminosäuren aus der Leber isoliert, womit der Stoffumsatz in der Leber erklärt wurde. Dieser Stoffumsatz wird bekanntlich durch das Fieber und die Aussentemperatur beeinflusst. In diesem Sinne hat Sibuya (1931) im hiesigen Institut stickstoffhaltige extraktive Stoffe der Krötenleber in der Sommerzeit untersucht, um den Einfluss der Aussentemperatur auf den Stoffwechsel im Krötenorganismus bzw. den Einfluss des Fiebers auf den Stoffwechsel der Säugetiere und des Menschen klarzustellen, andererseits um den Stoffwechselunterschied zwischen der Wach- und Winterschlafzeit kennen zu lernen, der schon bis zu einem gewissen Grade von Imamura (1922) aufgezeigt worden ist.

Diesmal habe ich die stickstoffhaltigen extraktiven Stoffe der Krötenleber in der Winterschlafzeit untersucht und die Resultate für die Wach- sowie für die Winterschlafzeit miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind folgende:

Ausser den stickstoffhaltigen Stoffen habe ich *d*-Milchsäure im Gewicht von 2,0199 g festgestellt und die Bernsteinsäure qualitativ nachgewiesen.

Es ist merkwürdig, dass das Tyrosin in der Sommerleber stärker als in der Winterleber vertreten ist, wogegen Leucin, Alanin bzw. Valin gerade das umgekehrte Verhalten zeigen.

	in der Winterleber		in der Sommerleber (nach Sibuya)
Glykokoll	—	—	—
Tyrosin	vorhanden	—	0,477 %
l-Leucin	27,5073 g	4,956 %	0,007 „
d-Isoleucin	—	—	0,002 „
d-Alanin	4,4523 g	0,802 %	wenig vorhanden
d-Valin	1,4357 „	0,258 „	„ „
l-Prolin	0,1301 „	0,023 „	0,002 %
dl-Prolin	wenig vorhanden	—	0,006 „
l-Serin	0,1967 g	0,035 %	—
l-Phenylalanin	0,1569 „	0,028 „	—
d-Glutaminsäure	0,1015 „	0,018 „	—
dl-Asparaginsäure	—	—	—
Guanin	0,0072 g	0,001 %	0,007 %
Adenin	0,1420 „	0,035 „	0,039 „
Xanthin	0,2500 „	0,045 „	0,012 „
Hypoxanthin	0,0744 „	0,013 „	0,013 „

Es scheint mir, dass der vermehrte Gehalt an Leucin, Alanin und Valin in der Leber der Winterschlafzeit auf der vermehrten Zuckerbildung aus diesen Aminosäuren beruhen dürfte, da nach den Beobachtungen von Imamura (1922) die Glykogenbildung der Krötenleber in der Winterschlafzeit viel stärker ist als in der Sommerzeit, obwohl die Glykogenie aus *dl*-Valin u. *dl*-Leucin von Dakin (1913) negiert wird. Die Zuckerbildung aus Aminosäure steht bekanntlich fest, wie von Ringer u. Lusk (1910), Dakin (1923), Mann u. Magath (1922) und Fuzita (1932) bewiesen wurde.

Der stark verminderte Gehalt an Tyrosin in der Leber der Winterschlafzeit beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass das aus Tyrosin gelieferte Hormon, wie Thyroxin, oder der Farbstoff, wie Melanin, in der Winterschlafzeit nicht so notwendig sein dürfte wie in der Sommerzeit.

#### BESCHREIBUNG DER VERSÜCHE

Für die Untersuchung standen mir die Lebern von 890 Kröten



zur Verfügung. Diese hatten nach möglichst schneller Reinigung von Blut und Bindegewebe ein Gewicht von 5550 g. Das gereinigte Material wurde in einer Fleischhackmaschine zerquetscht, mit dem 3fachen Quantum Wasser auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 40–45°C ca. eine Stunde lang extrahiert und koliert; der Rückstand wurde mehrmals in genau der gleichen Weise behandelt. Der kolierter Wasserauszug wurde mittels 20%iger Tanninlösung erschöpfend ausgefällt, und das überschüssige Tannin im Filtrat durch Baryt vollständig beseitigt. Das Filtrat wurde von überschüssigem Barium durch Zufuhr von Kohlensäure befreit. Die so vorbereitete Flüssigkeit wurde im Vakuum eingengt.

Aus der auf etwa ein Liter eingengten Lösung schieden sich weisse Kristalle, 25,204 g ab, die schwach bitter schmeckten und in wässriger Lösung amphoter wirkten. Nach mehrmaliger Umkristallisation der Kristalle aus heissem Wasser wurden glänzende, weisse, dünne Blättchen erhalten, die bei 291°C (in geschl. Röhrchen) schmelzen. Es wurde in 1%iger wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{27} = -11^\circ$  und bei 0,5 Prozent in 20%iger Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = +16,7^\circ$  gefunden.

0,1 g Subst. verbrauchten 7,65 ccm N/10  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

0,1 g Subst. verbrauchten 7,62 ccm N/10  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ : Ber. 10,69% N; Gef. 10,71% N, 10,67% N.

Durch Analyse und andere Eigenschaften ist der Kristall als *l*-Leucin identifiziert worden.

Der relativ schwer lösliche Teil des Leucin-Kristalls ergab die Hofmannsche Reaktion schwach positiv, aber aus dieser Fraktion konnte kein Kristall des Tyrosins erhalten werden.

Die von *l*-Leucin abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Äther 72 Stunden lang im Extraktionsapparate von Kumagawa-Suto extrahiert, um das Fett und Phosphatid zu entfernen. Bei stark schwefelsaurer Reaktion wurde sie wieder mit Äther in genau der gleichen Weise extrahiert. Der letzte Ätherauszug wurde abgedampft, und aus dem Rückstand das Zinksalz der Milchsäure, 3,1581 g, in üblicher Weise erhalten.

0,5604 g Subst. verloren 0,0718 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2\text{Zn} + 2\text{H}_2\text{O}$ : Ber. 12,89%  $\text{H}_2\text{O}$ ; Gef. 12,81%  $\text{H}_2\text{O}$ .

In seiner wässrigen Lösung dreht das Salz das polarisierte Licht nach links.

Das Filtrat des *d*-milchsauren Zinks ergab die Pyrrolreaktion. Es ist somit sicher, dass Bernsteinsäure zwar vorlag, aber nicht kristallinisch erhalten wurde.

Der mit Äther nicht extrahierbare Teil wurde in 5%iger schwefelsaurer Lösung mit 20%iger Phosphorwolframsäure erschöpfend gefällt und abfiltriert.

#### *Basenfraktion.*

Die Phosphorwolframsäurefällung wurde nach der Beseitigung der Phosphorwolframsäure genau so verarbeitet, wie es T. Shimizu (1921) beim Extrakt des Gehirns nach der modifizierten Methode von Kossel u. Kutscher mit grossem Erfolg durchgeführt hat. Zunächst wurden mit Hilfe von Silbernitrat die drei Fraktionen (Purinbasen-, Histidin-Arginin- u. Lysinfraktion) in saurer oder alkalischer Lösung hergestellt.

*Purinbasenfraktion.* Aus der in salpetersaurer Lösung abgeschiedenen Silberverbindung wurden die vier Basen in der bekannten Weise frei oder als Pikrat erhalten und in folgender Weise festgestellt.

Das Guanin wurde zur Reinigung in Natronlauge aufgelöst und durch Ansäuern mit Essigsäure gefällt. Die Ausbeute betrug 0,0072 g. Es zeigte die Weidelsche Reaktion und auch die Xanthinreaktion, wobei sich die Substanz mit einigen Tropfen Natronlauge blauviolett färbte.

Das Adenin wurde als Pikrat gewonnen und aus heissem Wasser umkristallisiert. Der Schmelzpunkt lag bei 280°C. Die Ausbeute betrug 0,1420 g. Das Pikrat wurde nach der von Weizmann, Yofe u. Kirzon (1930) beschriebenen beachtenswerten Methode analysiert.

0,0315 g Subst. verbrauchten 6,90 ccm  $N/10$   $H_2SO_4$ .

$C_5H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ : Ber. 30,78% N; Gef. 30,66% N.

Das Xanthin, welches aus Ammoniak gereinigt wurde, konnte insgesamt in einer Menge von 0,350 g gewonnen werden.

0,0310 g Subst. verbrauchten 8,13 ccm  $N/10$   $H_2SO_4$ .

$C_5H_4O_2N_4$ : Ber. 36,85% N; Gef. 36,71% N.

Das Hypoxanthin wurde als Pikrat identifiziert. Nach dem Umkristallisieren aus heissem Wasser betrug sein Gewicht 0.0744 g.

N-Bestimmung nach Weizmann, Yofe u. Kirzon.

0,0211 g Subst. verbrauchten 4,04 ccm  $N/10$   $H_2SO_4$ .

$C_5H_4ON_4 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ : Ber. 26,86% N; Gef. 26,80% N.

Die Histidin-Arginin- und Lysinfraktion muss weiter verfolgt werden.

#### *Aminosäurefraktion.*

Das durch Phosphorwolframsäurefällung erhaltene Filtrat wurde nach der Entfernung der Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure mit gesättigter Sublimatlösung und Barytwasser gefällt. Diese Fällung muss die Pyrimidinkörper enthalten.

Das Filtrat der Sublimatfällung wurde von Quecksilber und Baryt befreit und dann im Vakuum zu Sirup eingengt. Die Isolierung der Aminosäuren wurde nach E. Fischers Estermethode ausgeführt. Aus dem mit Alkohol unter Zufuhr von trockenem Salzsäuregas veresterten Material konnte kein Glykokoll-esterchlorhydrat isoliert werden.

Der von Salzsäure frei gewordene Aminosäureester wurde mittels Destillation in üblicher Weise in 4 Fraktionen fraktioniert, und zwar betrug die 1. Frak. 3,7005 g, die 2te 12,8326 g, die 3te 3,6894 g, die 4te 1,8722 g, der Phenylalaninester 0,4148 g u. der Rückstand 3,6126 g. Nach der Verseifung wurden die Aminosäuren aus allen Fraktionen einzeln durch ihre Löslichkeit oder durch ihr Kupfersalz isoliert.

#### *d-Alanin.*

In der wässrigen Lösung drehte die freie Säure das polarisierte Licht nach rechts.

Die Ausbeute betrug als Kupfersalz 6,0613 g.

0,0242 g Subst. gaben 0,0080 g CuO.

$(C_3H_6NO_2)_2Cu$ : Ber. 26,52% Cu; Gef. 26,41% Cu.

#### *l-Leucin.*

Die salzsaure Lösung dieser freien Aminosäure drehte das

polarisierte Licht nach rechts.

Die Ausbeute als Kupfersalz betrug 2,8667 g.

0,0398 g Subst. gaben 0,0097 g CuO.

$(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ : Ber. 19,63% Cu; Gef. 19,47% Cu.

#### *d-Valin.*

Diese Säure wurde nach dem Racemisieren in *dl*-Valin als Kupfersalz dargestellt.

Die Ausbeute betrug 1,8293 g.

0,0272 g Subst. gaben 0,0072 g CuO.

$(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$ : Ber. 21,49% Cu; Gef. 21,15% Cu.

Der vom racemisierten Valinkupfer befreite Teil hätte *d*-Isoleucin als Kupfersalz ergeben müssen. Dies zu erreichen gelang mir jedoch nicht.

#### *l-Prolin und dl-Prolin.*

Die freie Säure war in wässriger Lösung rechtsdrehend.

Die Ausbeute als Kupfersalz betrug 0,1661 g.

0,0251 g Subst. gaben 0,0068 g CuO.

$(C_5H_9NO_2)_2Cu$ : Ber. 21,79% Cu; Gef. 21,64% Cu.

So ist also *l*-Prolin festgestellt.

Der von *l*-Prolin befreite, in Alkohol fast unlösliche Rückstand wurde nur in geringer Menge geliefert und in schönen blauen Prismen kristallisiert. Er verfärbte sich violett im Vakuum-exsiccator über Schwefelsäure. Es ist also sicher, dass der Kristall aus *dl*-Prolin besteht.

#### *l-Phenylalanin.*

In wässriger Lösung drehte es das polarisierte Licht nach links.

Die Ausbeute als Chlorhydrat betrug 0,1916 g.

0,0391 g Subst. verbrauchten 1,92 ccm *N*/10  $H_2SO_4$ .

$C_9H_{11}O_2NHCl$ : Ber. 6,95% N; Gef. 6,81% N.

#### *d-Glutaminsäure.*

Sie drehte rechts in salzsaurer Lösung.



Die Ausbeute als Chlorhydrat betrug 0,1267 g.

0,0461 g Subst. verbrauchten 2,49 ccm  $N/10$   $H_2SO_4$ .

$C_5H_9O_4NHCl$ : Ber. 7,64% N; Gef. 7,56% N.

Aus der mit Baryt verseiften Lösung des Esters wurde nur *d*-Glutaminsäure, aber kein Bariumsalz der racemischen Asparaginsäure isoliert.

#### *l-Serin.*

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrates wurde nach dem Entfernen der Salzsäure stark eingeeengt, wobei der Kristall in der Kälte ( $2^\circ C$ ) gewonnen wurde. Er wurde aus kaltem Wasser umkristallisiert.

Er beginnt bei etwa  $203^\circ C$  braun zu werden und zersetzt sich bei etwa  $222-223^\circ C$  unter Aufschäumen. Er schmeckt süß und dreht das polarisierte Licht nach links.

Ausbeute: 0,1967 g.

0,0325 g Subst. verbrauchten 3,08 ccm  $N/10$   $H_2SO_4$ .

$C_3H_7NO_3$ : Ber. 13,37% N; Gef. 13,27% N.

#### LITERATUR.

- Berlin, E. u. Kutscher, F. (1924): Zeitschr. f. Biol., **81**, 87.  
Dakin, H. D. (1913): Jl. of Biol. Chem., **14**, 321.  
Dakin, H. D. (1923): Jl. of Biol. Chem., **56**, 43.  
Fischer, E. (1901): Zeitschr. f. physiol. Chem., **33**, 151.  
Flössner, O. u. Kutscher, F. (1929): Zeitschr. f. Biol., **88**, 390.  
Fuzita, S. (1932): Arb. Med. Univ. Okayama, **3**, 192.  
Hiwatari, Y. (1927): Jl. of Biochem., **7**, 161.  
Imamura, A. (1922): Mitteil. a. d. med. Fak. Tokyo, **28**, 1.  
Mann, F. C. u. Magath, T. B. (1922): Arch. intern. Med., **30**, 73 u. 171.  
Ringer, A. I. u. Lusk, G. (1910): Zeitsch. f. physiol. Chem., **66**, 106.  
Shimizu, T. (1921): Biochem. Zeitschr., **117**, 252.  
Sibuya, S. (1931): Jl. of Biochem., **14**, 111.  
Smorodinzew, J. (1912): Zeitschr. f. physiol. Chem., **80**, 218.  
Weizmann, M., Yofe, J. u. Kirzon, B. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chem., **192**, 70.



## ZUM DESAMINIERUNGSVORGANG DER AMINO-SÄUREN IM TIERISCHEN ORGANISMUS.

VON

Y. KOTAKE SR., Y. KOTAKE JR. UND I. TANIGUCHI.

*(Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Universität zu Osaka.)*

(Eingegangen am 28. Juli 1933)

Die Frage, ob die Aminosäuren im Tierkörper physiologischerweise hydrolytisch desaminiert werden, wurde noch nicht mit Sicherheit beantwortet. Bisherige diesbezügliche Ergebnisse beziehen sich meist auf Untersuchungen mit körperfremden Aminosäuren. Sie sind jedoch deshalb unsicher, weil man annimmt, dass ein Katalysator, der sich im Organismus befindet, oft nur auf körpereigene Substanz eingestellt ist.

Wir haben des öfteren versucht, auf irgend eine Weise die vorgelegte Frage zu lösen, was uns jedoch nicht bis zur vollsten Genauigkeit gelang; denn bei diesem Studium halten wir es für notwendig dass eine natürliche Aminosäure in möglichst kleiner Menge verwendet wird. Andernfalls wirkt sie, sei sie auch eine natürliche, gleichsam wie ein Fremdkörper.

Die erstere Verwendungsweise ist leider mit dem Nachteil verbunden, dass die Aminosäure leicht gänzlich verbrannt wird, sodass ihre Desaminierungsprodukte kaum nachweisbar sind. Grosses Gewicht ist also auf die Wahl einer passenden Aminosäure zu legen. Weiter muss man bestrebt sein, eine Mikromethode zu finden, die gestattet, die gebildeten Desaminierungsprodukte schon in kleiner Menge mit Sicherheit zu bestimmen.

Auf diese Erwägung hin haben wir wieder Tyrosin angewendet, das bei Desaminierung im Tierkörper Oxyphenylbrenztraubensäure und Oxyphenylmilchsäure liefert. Möglicherweise treten die beiden letzteren bereits im normalen Harn auf, wenn man den Bericht von Medes (1932) über eine Stoffwechselanomalie in Betracht zieht, sodass der Gedanke nahe liegt, dass, wenn man

wenigstens Tyrosin in einen Organismus einführt, es schon in einer kleinen Menge die genannte Ketosäure und Alkoholsäure als messbar im Harn ausscheidet.

Zur Mikrobestimmung der beiden Säuren haben wir mit Erfolg unser sogenanntes Jodsäureverfahren verwendet.

Im folgenden möchten wir die Methode und die damit gewonnenen Resultate kurz mitteilen:

#### I. MIKROBESTIMMUNG DER OXYPHENYLBRENTZTRAUBENSÄURE IM HARNE.

Nach den Untersuchungen von Chikano (1929) in unserem Laboratorium besitzt Oxyphenylbrenztraubensäure einen hohen Jodsäurewert. Andere ebenfalls ätherlösliche Substanzen, die im gewöhnlichen Harn enthalten sind, zeigen dagegen höchstens einen niedrigen Jodsäurewert. Es lässt sich also vermuten, dass der Gehalt des Harns an Oxyphenylbrenztraubensäure ungefähr bestimmt werden kann, wenn der zu untersuchende vorher angesäuerte Harn mit Äther ausgeschüttelt und der Ätherrückstand nach Chikano mit Jodat behandelt wird.

Aus einigen Harnproben, vor allem bei Tyrosinfütterung, ergab sich aber, dass die Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn sich bei alleiniger Anwendung der obigen Behandlung nicht genau bestimmen lässt. Es schienen uns hierbei andere Substanzen, wie Oxyphenylmilchsäure, beigemischt zu sein. Durch weitere Untersuchungen haben wir diese Störung durch Fixierung der ersteren mittels Natriumbisulfits beseitigen können, d.h. es gelang uns auf diese Weise die Oxyphenylbrenztraubensäure mit guter Genauigkeit zu bestimmen in einer so geringen Menge, wie sie schon im normalen Harn ausgeschieden wird.

Der Jodsäurerestwert des normalen Harns scheint durch verschiedene Substanzen bedingt zu sein, unter denen wahrscheinlich auch *l*-Oxyphenylmilchsäure einen geringen Anteil ausmacht. Wenn man jedenfalls diesen Restwert bei Tyrosinverfütterung näher betrachtet, so kann man die Menge der *l*-Oxyphenylmilchsäure approximativ bestimmen.

*Methodik.**A. Erforderliche Reagentien und Apparate.*

n/200 Kaliumjodatlösung, n/200 Natriumthiosulfatlösung, 5% Jodkaliumlösung, 10% Schwefelsäure und 1% Stärklösung.

Ein besonderes Wasserbad mit Reagenzröhren aus starkem Glase, Mikrobüretten, Scheidetrichter von etwa 50 ccm Inhalt, Pipetten, Becher von ca. 50 ccm Inhalt, Trichter und mit Äther ausgewaschenes Filterpapier.

*B. Ausführung und Benennung der Titrationswerte.**1. Jodsäuregesamtwert.*

Vom zu untersuchenden filtrierten Harn werden 2 ccm in einen Scheidetrichter mittels Pipette eingefüllt, mit 4 Tropfen 15%iger Schwefelsäure angesäuert und dreimal mit 10 ccm Äther,\* also im ganzen mit 30 ccm Äther ausgeschüttelt. Der gesammelte Äther wird mit einem kleinen Trichter mit vorher gereinigtem Filterpapier filtriert und dieses mit 10 ccm Äther durchgespült.

Der Gesamtäther wird nun in einem Becherglas auf dem Wasserbade langsam verdunstet, indem zum Schlusse der letzte Restäther durch leises Pusten verjagt wird. Der Rückstand wird nun mit 10 ccm destilliertem Wasser warm aufgenommen, und die Lösung nach dem Erkalten filtriert. Von dem Filtrat werden 5 ccm in ein Reagenzglas abpipettiert, 2 ccm n/200 Kaliumjodatlösung hinzugefügt und 15 Minuten lang im lebhaft siedenden Wasserbade mit Hilfe von einem Halter erhitzt. Dann wird die Flüssigkeit mit 2 ccm 10%iger Schwefelsäure versetzt und das Glas mit dem Halter 15 Minuten lang im Wasserbade von 15° eingetaucht. Darauf wird 5%ige Jodkaliumlösung hinzugefügt und nach 5 minutigem Stehenlassen titriert durch n/200 Natriumthiosulfatlösung unter Anwendung von Stärkelösung als Indikator.

---

\* Gewöhnlicher Äther lässt beim Verdunsten einen Rückstand zurück, der einen Jodsäurewert besitzt. Er muss deshalb bei unserem Versuch vorher gereinigt werden. Dazu haben wir ihn mit metallischem Natrium von Alkohol befreit und vorsichtig mehrmals destilliert.



## 2. Jodsäurerestwert.

2 ccm desselben filtrierten Harns werden wie oben behandelt. Der Ätherrückstand wird nun mit 10 ccm gesättigter Natriumbisulfitlösung versetzt und eine Weile auf dem Wasserbade von 70°C erwärmt. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit im Scheidetrichter dreimal mit je 10 ccm Äther ausgeschüttelt, filtriert und das Filterpapier einmal mit 10 ccm Äther durchgespült. Der Gesamtäther wird dann mit wenig Wasser zweimal ausgewaschen. Der getrennte Äther wird nun auf dem Wasserbade verjagt, wie oben geschildert, und im Rückstand der Jodsäurewert bestimmt.

## 3. Jodsäureketowert.

Der Jodsäurerestwert wird vom Jodsäuregesamtwert abgezogen.

## C. Berechnung des Oxyphenylbrenztraubensäuregewichts aus dem gefundenen Titrationswert.

Aus den zahlreichen Proben, die einerseits mit den eventuell im Harn auftretenden ätherlöslichen Substanzen, insbesondere aromatischen Säuren, andererseits mit einem Harn, dem eine bestimmte Menge synthetische Oxyphenylbrenztraubensäure hinzugefügt worden war, ausgeführt wurden, ergab sich, dass unser sogenannter Jodsäureketowert des Harns wenigstens zum allergrössten Teil von der Oxyphenylbrenztraubensäure herrühren muss.

Unter anderem könnte man folgende Tatsachen als dafür sprechend nennen: Diese Fraktion gibt stets mehr oder weniger intensive Millonsche Reaktion, ist durch Bleiessig fällbar und geht in alkalischer Reaktion nicht mehr in Äther über. Bei den Tyrosinversuchen konnten wir stets aus dem Harn mehr oder weniger Oxyphenylbrenztraubensäure, entsprechend seinem Jodsäureketowert, isolieren.

Daraufhin haben wir es unternommen, aus einem gefundenen Jodsäurewert das dementsprechende Oxyphenylbrenztraubensäuregewicht ausfindig zu machen. Es war dazu vor allem erforderlich, dass der Jodsäurewert der Oxyphenylbrenztraubensäure in seinen verschiedenen Konzentrationen bestimmt wird. Die hierbei als

Material gebrauchte Oxyphenylbrenztraubensäure wurde nach O. Neubauer (1909) synthetisiert, wie früher von Kotake (1910), und sehr gründlich gereinigt. Unser Präparat kristallisierte in glänzenden sechseitigen Makrotafeln und schmolz bei langsamem Erhitzen bei 220°C.

Die Oxyphenylbrenztraubensäure wurde in einer bestimmten Menge Wasser gelöst, die Lösung durch Zusatz von destilliertem Wasser in verschiedenen Konzentrationen verdünnt, und in 1 ccm der Lösungen der Jodsäurewert unter denselben Bedingungen, wie oben beschrieben, bestimmt.

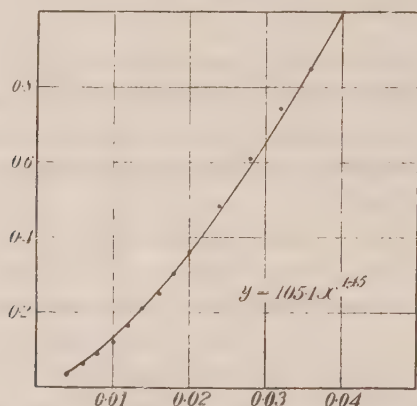
Gelegentlich haben wir auch den Jodsäurewert der Oxyphenylmilchsäure, u. zw. der *l*-Form bestimmt, die im Harn z.B. bei Phosphorvergiftung ausgeschieden wird. Dieser Wert ist sehr niedrig im Vergleich zu dem der Oxyphenylbrenztraubensäure. Wir fanden in 1 ccm 0,1%iger *l*-Oxyphenylmilchsäure nur 0,040–0,050. Die Konzentration und der Jodsäurewert der Oxyphenylmilchsäure verlaufen in ihrem bestimmten Konzentrationsbereich ungefähr parallel miteinander.

TABELLE I.

Konzentration (%)	Jodsäurewert Oxyphenylbrenztraubensäure
0,040	1,012
0,036	0,848
0,032	0,747
0,028	0,610
0,024	0,484
0,020	0,362
0,018	0,304
0,016	0,250
0,014	0,212
0,012	0,169
0,010	0,117
0,008	0,089
0,006	0,063
0,004	0,037

Wenn man diese Resultate in einer Kurve niederlegt, so kommt man zu der unten wiedergegebenen Figur.

Fig. 1.



Diese Kurve lässt sich durch die folgende Formel ausdrücken:

$$y = ax^b,$$

und zwar bedeutet  $y$  = Jodsäurewert,  $x$  = Konzentration der Substanz.

Wenn man  $a$  und  $b$  aus der Kurve berechnet, so ergeben sich folgende Zahlenwerte:

$$y = 105,1 \cdot x^{1,45}$$

Aus dieser Tabelle ergibt sich, dass der gefundene Jodsäurewert bei einer Konzentration von 0.004–0.04% mit dem berechneten Jodsäurewert gut übereinstimmt.

*Vergleich des ausgerechneten Gewichts der Oxyphenylbrenztraubensäure mit dem wirklich gefundenen Gewicht derselben Fraktion.*

150 oder 200 ccm Harn wurden mit einer bestimmten Menge 15%iger Schwefelsäure angesäuert und im Extraktionsapparat von Kumagawa und Suto zwei Stunden lang extrahiert. Der Äther

TABELLE II.

	Gefundener Jodsäurewert	y (berechneter) Jodsäurewert	Differenz
0,004	0,037	0,034	0,003
0,006	0,063	0,063	0,000
0,008	0,089	0,095	0,006
0,010	0,117	0,132	0,015
0,012	0,169	0,172	0,003
0,014	0,212	0,216	0,004
0,016	0,250	0,261	0,011
0,018	0,304	0,310	0,006
0,020	0,362	0,361	0,001
0,024	0,484	0,471	0,013
0,028	0,610	0,588	0,022
0,032	0,747	0,714	0,027
0,036	0,848	0,847	0,001
0,040	1,012	0,987	0,025

wurde im Vakuum-Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand wurde nun in wenig Wasser unter Erwärmen gelöst, die Lösung mit vorher durch Äther erschöpftem Natriumbisulfit gesättigt und wieder im genannten Extraktionsapparat 5 Stunden lang ausgezogen. Der aus dem getrennten Äther gewonnene Rückstand wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und gewogen. Dieses Gewicht wurde von dem vorher erhaltenen abgezogen und dies mit demjenigen, das aus dem gleichen Harn durch unsere Methode gefunden wurde, verglichen. Es ergab sich:

TABELLE III.

Menschenharn

Menge	wirkl. gefund. Gewicht	Durch Titration gefund. Gewicht
200	0,0317	0,0196
200	0,0396	0,0180
200	0,0486	0,0195
200	0,0310	0,0150

## Kaninchenharn

Menge	wirkl. gefund. Gewicht	Durch Titration gefund. Gewicht
150	0,0310	0,0160
150	0,0315	0,0220
150	0,0261	0,0140

Da aber der Ätherrückstand im sirupösen Zustand getrocknet wurde, war wohl stets auch noch im konstanten Gewicht eine gewisse Menge Wasser enthalten. Wahrscheinlich sind sogar in dieser Fraktion noch andere Substanzen als Oxyphenylbrenztraubensäure, z.B. Phynylbrenztraubensäure, Brenztraubensäure etc., enthalten. Man könnte hierdurch die Tatsache erklären, dass das aus dem Jodsäurewert berechnete Gewicht stets grösser als das wirklich gefundene ist. Der Umstand, dass dessenungeachtet dieses Verhältnis oft nur 1 : 1,5 beträgt, scheint uns über Erwarten günstig.

Gelegentlich haben wir bei diesen Versuchen im direkt aus dem Harn gewonnenen Ätherrückstand seine Beschaffenheit wiederum näher untersucht. Es wurde gefunden, dass der Rückstand, besonders, wenn er einen hohen Jodsäurewert zeigte, eine starke Millonsche Reaktion gab, und dass der Anteil, der durch Bleiessig gefällt wurde, einen hohen Jodsäurewert besass. Dies spricht, wie oben angegeben, auch dafür dass unser Jodsäureketowert zum grössten Teil von der Oxyphenylbrenztraubensäure bedingt wird.

Natürlich kann der Harn, wie oben erwähnt, andere ätherlösliche Keto- und Aldehydschubstanzen enthalten, die sich selbstverständlich durch Natriumbisulfit fixieren lassen. Nach unseren genaueren Untersuchungen haben wir jedoch nie solche ätherlösliche Substanzen getroffen, die einen so hohen Jodsäurewert wie Oxyphenylbrenztraubensäure zeigen. Zum Beispiel zeigte Phenylbrenztraubensäure nur eine schwache Wirkung auf Jodsäure bei unserem Verfahren. Das Gleiche gilt für Brenztraubensäure.



*Jodsäurewerte der verschiedenen Tierharne.*

Einige Bestimmungen, die nach unserer Methode im normalen Harn einiger Tiere ausgeführt wurden, gaben folgenden Resultate. Die Zahlen müssen aber natürlich schwankend sein, je nach den Umständen, insbesondere Alter, Nahrung, Aussentemperatur etc. Unsere Untersuchungen sind aber insofern interessant, als die Ausscheidung der Oxyphenylbrenztraubensäure beim Kaninchen stets viel grösser als beim Hunde ist, und als der Mensch gerade eine Zwischenstellung einnimmt.

Alle Bestimmungen wurden im Winter in 1 ccm von 24 stündigem Harn ausgeführt.

TABELLE IV.

Mensch

Nr.	Jodsäuregesamtwert	Jodsäureketowert	Jodsäurerestwert
1.	0,262	0,173	0,089
2.	0,303	0,206	0,097
3.	0,216	0,150	0,066
4.	0,239	0,181	0,058
5.	0,340	0,238	0,102

Kaninchen

1.	0,364	0,234	0,130
2.	0,345	0,250	0,095
3.	0,420	0,295	0,125
4.	0,412	0,260	0,152
5.	0,458	0,368	0,090

Hund

1.	0,100	0,053	0,047
2.	0,105	0,055	0,050
3.	0,138	0,100	0,038
4.	0,140	0,110	0,030

## II. FÜTTERUNGSVERSUCHE MIT TYROSIN.

## 1. Untersuchungen mit eintägigem Harn.

Einer von uns (Y. Kotake sr.) hat bereits vor etwa 10 Jahren

(1923) mit seinen Schülern den Beweis erbracht, dass das Tyrosin bei reichlicher Verfütterung eine geringe Menge Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn ausscheidet. Da wir jetzt die letztere mikromethodisch mit guter Genauigkeit zu bestimmen imstande sind, haben wir es unternommen, mit dieser Hilfe unsere früheren Ergebnisse nachzuprüfen. Wir hielten dies deswegen für nötig, weil Shambough, Lewis und Tourtellotte(1932) bei einer Überprüfung unseren Befund nicht bestätigen konnten.

Der Kürze halber haben wir sämtliche Resultate in folgenden Tabellen zusammengestellt:

*Versuche beim Kaninchen.*

TABELLE V.

Datum	Körper- gew.	Harn- Menge	Spez. Gew.	Jodsäure-Wert (1 cem Harn)			Bemerkungen
				Gesamt-	Keto-	Rest-	
3/X	2500	174	1007	0,490	0,420	0,070	
4.	2520	180	1012	0,505	0,422	0,083	
5.	2540	170	1012	0,478	0,413	0,065	
<i>dl-Tyrosin 0.5 g (in 10 cem Wasser)</i>							
6.	2550	200	1014	0,618	0,548	0,070	
7.	2570	200	1014	0,430	0,360	0,070	
<i>dl-Tyrosin 1,0 g (in 10 cem Wasser)</i>							
8.	2540	180	1012	1,200	1,120	0,080	
9.	2550	160	1012	0,308	0,243	0,065	
10.	2570	180	1014	0,456	0,373	0,083	
<i>dl-Tyrosin 2 g (in 15 cem Wasser)</i>							
11.	2570	180	1014	3,333	3,227	0,106	
12.	2580	140	1016	0,675	0,590	0,085	
13.	2600	143	1010	0,630	0,510	0,120	
<i>l-Tyrosin 2 g (in 15 cem Wasser)</i>							
14.	2600	224	1012	0,510	0,440	0,070	
15.	2610	180	1012	0,413	0,338	0,075	

*dl*-Tyrosin 2 g (in 15 ccm Wasser)

16.	2610	227	1012	3,935	3,825	0,110	Oxyphenylbrenz- traubensäure Schmelzp. 209° C
17.	2610	167	1014	1,050	0,930	0,120	
18.	2590	160	1014	0,502	0,422	0,080	
19.	2620	174	1014	0,563	0,468	0,095	

*l*-Tyrosin 5 (in 25 ccm Wasser)

20.	2620	192	1014	7,860	7,656	0,204	Oxyphenylbrenz- traubensäure Schmelzp. 212-3° C
21.	2670	140	1016	0,930	0,757	0,173	
22.	2680	154	1014	0,560	0,440	0,120	
23.	2640	140	1016	0,550	0,435	0,115	
24.	2640	184	1014	0,500	0,413	0,087	

## 2.

Datum	Körper- gew.	Harn- Menge	Spez. Gew.	Jodsäure-Wert (1 ccm Harn)			Bemerkungen
				Gesamt	Keto	Rest	
19/XI	2300	240	1012	0,348	0,268	0,080	
20.	2340	240	1014	0,255	0,180	0,075	
21.	2340	256	1010	0,319	0,234	0,085	
22.	2340	242	1014	0,325	0,235	0,090	
23.	2370	230	1014	0,340	0,250	0,090	

*dl*-Tyrosin 1,0 g (in 10 ccm Wasser)

24.	2360	250	1010	1,158	1,063	0,095
25.	2380	190	1018	0,535	0,430	0,105
26.	2390	194	1015	0,330	0,245	0,085

## Oxyphenylbrenztraubensäure 0,5 g (in 10 ccm Wasser)

27.	2390	80	1020	1,150	0,955	0,195	Oxyphenylmilch- säure Schmelzp. 166-167° C
28.	2380	190	1019	0,531	0,425	0,106	
29.	2440	235	1016	0,318	0,228	0,090	
30.	2380	240	1014	0,300	0,220	0,080	

*l*-Tyrosin 2 g (in 20 ccm Wasser)

1/XI	2400	230	1012	0,325	0,225	0,100
2.	2410	200	1013	0,390	0,275	0,120

10.	l-Tyrosin 5 g (in 40 ccm Wasser)					
11.	2480	225	1018	0,868	0,733	0,135
12.	2480	210	1016	0,600	0,480	0,120
13.	2400	210	1016	0,450	0,360	0,090
14.	2450	190	1016	0,350	0,265	0,085
15.	2470	190	1014	0,340	0,255	0,085

## 3.

Datum	Körper- gew.	Harn- Menge	Spez. Gew.	Jodsäure-Wert (1 cem Harn)			Bemerkungen	
				Gesamt	Keto-	Rest-		
18/I	2590	180	1016	0,354	0,239	0,115		
19.	2570	200	1014	0,350	0,260	0,090		
20.	2570	180	1014	0,363	0,267	0,096		
<i>d</i> -Oxyphenylmilchsäure 1 g (in 20 cem Wasser)								
21.	2600	220	1016	0,518	0,328	0,190		Nadelförmige Kristalle. Millon-Reakt. und FeCl <sub>3</sub> -Reakt.
22.	2620	176	1016	0,673	0,528	0,150		
23.	2600	160	1014	0,480	0,350	0,130		
24.	2620	186	1012	0,390	0,295	0,095		
25.	2620	203	1012	0,370	0,280	0,090		
<i>dl</i> -Oxyphenylmilchsäure 1 g (in 20 cem Wasser)								
26.	2620	195	1010	0,638	0,495	0,143	FeCl <sub>3</sub> -Reakt. und Millon-Reakt.	
27.	2620	180	1012	0,535	0,415	0,120		
28.	2630	200	1012	0,430	0,315	0,115		
29.	2660	175	1012	0,460	0,350	0,110		
<i>d</i> -Oxyphenylmilchsäure 1 g (in 20 cem Wasser)								
30.	2630	215	1014	0,543	0,388	0,155		
31.	2640	230	1010	0,605	0,480	0,125		
1/II	2650	205	1014	0,440	0,345	0,095		
2.	2650	215	1012	0,500	0,365	0,135		
3.	2650	195	1012	0,350	0,260	0,090		

*Versuche beim Hunde.*

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, nimmt bei Kaninchen bei reichlicher Fütterung mit Tyrosin die Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn beträchtlich zu, u. zw. wird die letztere aus *l*-Tyrosin

erst bei Verwendung von 5 g, aus *dl*-Tyrosin aber bereits bei 1 g deutlich ausgeschieden.

Eine physiologische Umwandlung der Oxyphenylbrenztraubensäure und der Oxyphenylmilchsäure ineinander lässt sich auch klar aus der Bestimmung des Jodsäureketowertes und -restwertes im Harn ersehen.

Beim Hunde fanden wir des öfteren, dass das Tyrosin, besonders das *dl*-Tyrosin, nicht so leicht wie beim Kaninchen vom Darm aus resorbiert, sondern zum Teil als solches unter Bildung einer kompakten Masse im Kot ausgeschieden wurde.

Im folgenden Versuche wurde aber das Tyrosin relativ besser resorbiert, sodass in diesem Falle keine unveränderte Substanz im Kot nachgewiesen wurde.

Hier sieht man wieder, dass das *dl*-Tyrosin im Vergleich zum *l*-Tyrosin viel leichter Oxyphenylbrenztraubensäure ausscheidet. Bei diesem Versuche hat eine Verabreichung von 5 g *l*-Tyrosin fast gar keine Ausscheidung der Oxyphenylbrenztraubensäure verursacht. (Dieselbe Beziehung ist auch beim Menschen bemerkbar. Bei einem Mädchen von 47 kg Körpergewicht konnten wir bei Verabreichung per os von 10 g *l*-Tyrosin keine Mehrausscheidung der Ketosäure beobachten, während bei *dl*-Tyrosin beim Gebrauch von 3 g eine zweifellose Erhöhung des Ketowertes nachgewiesen wurde).

TABELLE VI.

Datum	Körper- gew. kg	Harn- Menge	Spez. Gew.	Jodsäure-Wert (1 ccm Harn)			Bemerkungen
				Gesamt-	Keto-	Rest-	
7/III	4,74	245	1012	0,085	0,065	0,020	
8.		285	1012	0,070	0,050	0,020	
9.		230	1012	0,085	0,060	0,025	
10.	4,57	200	1012	0,087	0,065	0,022	
Oxyphenylbrenztraubensäure 1 g (in 20 ccm Wasser)							
11.		310	1015	0,243	0,182	0,061	
12.		240	1012	0,090	0,057	0,033	
13.	4,60	240	1014	0,085	0,055	0,030	



## d-Oxyphenylmilchsäure 1 g (in 30 ccm Wasser)

14.		245	1012	0,170	0,108	0,062
15.		250	1014	0,040	0,020	0,020
16.	4,60	240	1014	0,087	0,057	0,030

## dl-Tyrosin 2 g (in 60 ccm Wasser)

17.		245	1016	0,275	0,220	0,055
18.		230	1012	0,060	0,030	0,030
19.	4,60	265	1012	0,077	0,044	0,033

## l-Tyrosin 5 g (in 80 ccm Wasser)

20.		225	1012	0,087	0,052	0,035	gut resorbiert
21.		200	1014	0,095	0,055	0,040	

## 2. Untersuchungen mit 1-3 stündigem Harn.

Nach unseren Erfahrungen verläuft die Desaminierung des Tyrosins nach seiner Einverleibung ziemlich schnell. Wenn man also mittels unserer Methode im Harne den Jodsäureketowert und -restwert binnen kurzer Zeit nach der Tyrosinverwendung ermittelt, so ist es möglich, ein Resultat zu erzielen, das ohne weiteres den Desaminierungsvorgang wiedergibt, wenn auch die gebildete Oxyphenylbrenztraubensäure und Oxyphenylmilchsäure im Körper zum Teil bald nach ihrer Entstehung ineinander übergeben.

Die Versuche wurden sämtlich an Kaninchen ausgeführt. Die Resultate sind in folgenden Tabellen zusammengestellt:

TABELLE VII

1.

Harn		Jodsäurewert (1 ccm)			Berechnet pro 3 Stdn.				K/R
					Harn- menge	Jodsäurewert			
entnommen	Menge	Gesamt	Keto	Rest		Gesamt	Keto	Rest	
Während 24 Stdn.	154	0,613	0,505	0,108	19,3	11,83	9,75	2,08	3,48
dl-Tyrosin 1 g (in 20 ccm Wasser)									
nach 3 Stdn.	29	2,862	2,734	0,128	29,0	73,00	69,29	3,71	18,67
6 „	12	7,046	6,903	0,143	12,0	84,56	82,84	1,72	48,16
12 „	26,5	1,663	1,520	0,143	13,3	22,12	20,22	1,90	10,64
18 „	15	1,098	0,925	0,173	7,5	8,24	6,94	1,30	5,34
24 „	11	1,093	0,900	0,193	5,5	6,01	4,95	1,06	4,67

2.

Harn		Jodsäurewert (1 cem)			Berechnet pro 1,5 Stdn.				K/R
					Harn- menge	Jodsäurewert			
entnommen	Menge	Gesamt-	Keto-	Rest-		Gesamt-	Keto-	Rest-	
Während 24 Stdn.	180	0,410	0,270	0,135	11,3	4,85	3,05	1,53	1,99
l-Tyrosin 2 g (in 20 cem Wasser)									
nach 1,5 Stdn.	16,5	0,290	0,195	0,095	16,5	4,79	3,22	1,57	2,05
3    „	30,5	0,180	0,100	0,080	30,5	5,49	3,05	2,44	1,25
6    „	20,0	0,400	0,280	0,120	10,0	4,00	2,80	1,20	2,33
9    „	19,6	0,495	0,335	0,140	9,8	4,85	3,48	1,37	2,54
12   „	18,0	0,545	0,420	0,125	9,0	4,91	3,78	1,13	3,36

3.

Harn		Jodsäurewert (1 cem)			Berechnet pro 1,5 Stdn.				K/R
					Harn- menge	Jodsäurewert			
entnommen	Menge	Gesamt-	Keto-	Rest-		Gesamt-	Keto-	Rest-	
Während 24 Stdn.	218	0,300	0,210	0,090	13,6	4,08	2,86	1,22	2,34
dl-Tyrosin 2 g (in 20 cem Wasser)									
nach 1,5 Stdn.	46,5	0,170	—	—	46,5	—	—	—	
3 „	26,5	1,130	0,820	0,310	26,5	29,95	21,73	8,22	2,64
6 „	10,5	9,880	9,213	0,667	5,3	52,37	48,83	3,54	13,67
9 „	20,0	1,930	1,725	0,205	10,0	19,30	17,25	2,05	8,42
12 „	11,0	2,160	1,845	0,315	5,5	11,88	10,15	1,73	5,87

4.

Harn		Jodsäurewert (1 cem)			Berechnet pro 3 Stdn.				K/R
					Harn- menge	Jodsäurewert			
entnommen	Menge	Gesamt-	Keto-	Rest-		Gesamt-	Keto-	Rest-	
Während 24 Stdn.	194	0,352	0,232	0,120	24,3	8,56	5,64	2,92	1,93

*DL*-Tyrosin 2 g (in 20 ccm Wasser)

nach 3 Stdn.	45	2,310	2,213	0,097	45,0	103,96	99,59	4,37	22,78
„ 6 „	14	19,270	19,070	0,200	14,0	269,78	266,98	2,80	95,35
„ 12 „	13	6,090	5,685	0,305	6,5	38,93	36,95	1,98	18,66
„ 18 „	11	1,755	1,475	0,280	5,5	9,65	8,11	1,54	5,27
„ 24 „	14	1,575	1,275	0,300	7,0	11,03	8,93	2,10	4,25

5.

Harn		Jodsäurewert (1 ccm)			Berechnet pro 1,5 Stdn.				K/R
					Harn- menge	Jodsäurewert			
entnommen	Menge	Gesamt-	Keto-	Rest-		Gesamt-	Keto-	Rest-	
Während 24 Stdn.	240	0.208	0.120	0.088	15.0	3.03	1.71	1.32	1.30

*L*-Tyrosin 2 g (in 20 ccm Wasser)

nach 1,5 Stdn.	20,0	0,138	0,028	0,110	20,0	2,76	0,56	2,20	0,25
3 „	9,5	0,245	0,129	0,116	9,5	2,33	1,23	1,10	1,20
6 „	17,5	0,338	0,220	0,118	8,7	2,95	1,92	1,03	1,86
9 „	6,5	0,734	0,523	0,211	3,3	2,39	1,70	0,69	2,46
12 „	7,0	0,628	0,402	0,226	3,5	2,20	1,41	0,79	1,78

6

Harn		Jodsäurewert (1 ccm)			Berechnet pro 3 Stdn.				K/R
					Harn- menge	Jodsäurewert			
entnommen	Menge	Gesamt-	Keto-	Rest-		Gesamt-	Keto-	Rest-	
Während 24 Stdn.	180	0,370	0,265	0,110	22,5	8,44	5,96	2,48	2,42

*L*-Tyrosin 2 g (in 20 ccm Wasser)

nach 3 Stdn.	20,0	0,445	0,270	0,175	20,0	8,90	5,40	3,50	1,54
„ 6 „	6,5	1,540	1,300	0,240	6,5	10,01	8,45	1,56	5,42
„ 12 „	10,0	1,435	1,210	0,225	5,0	7,18	6,05	1,13	5,35
„ 24 „	15,5	0,940	0,810	0,130	3,9	3,67	3,16	0,51	6,20

## III. DURCHBLUTUNGSVERSÜCHE MIT TYROSIN.

## 1. Untersuchungen durch eine Leber- Niere-Kombination.

Da aber das Tyrosin bei den oben angegebenen Versuchen fast

immer per os verabreicht wurde, ist es nicht ganz ausgeschlossen, dass die sich dabei abspielende Desaminierung zum Teil im Darmkanal stattfindet. In der Absicht, diese Möglichkeit auszuschalten, haben wir von neuem Durchblutungsversuche angesetzt, indem als überlebende Organe eine Kombination der Leber mit der Niere angewendet wurde. Als unsere Versuche gerade abgeschlossen worden waren, erschien eine Arbeit von Krebs (1933) in Hoppe-Seylers Zeitschrift, worin mitgeteilt wurde, dass bei Desaminierung der Aminosäuren im Tierkörper Leber und Niere eine Hauptrolle spielen. Deshalb glauben wir, dass unser Arbeitsplan in einer passenden Weise gewählt war.

Die Durchblutung erfolgt bei 38°C unter Druck von 30 mm Hg, u. zw. wurde das Blut erst in die Niere eingeführt und dabei derart reguliert, dass das von der Niere ausfliessende Venenblut pro 1 Minute 80–100 Tropfen zählte. Das übrige Blut wurde von der Pfortader in die Leber in einer passenden Schnelligkeit gelassen, indem das ganze Blut in einer eingeschalteten Flasche lebhaft mit Sauerstoff gespeist wurde. Der während des Versuchs vom Harnleiter eliminierte Harn wurde 2 Stunden lang je 1 Stunde gesondert aufgesammelt und untersucht.

Ferner haben wir den ganzen gesammelten Harn auf Isolierung der Oxyphenylbrenztraubensäure und Oxyphenylmilchsäure untersucht. Die Resultate sind ebenfalls in den Tabellen zusammengestellt.

## 2. *Untersuchungen unter Verwendung der Niere.*

(ausgeführt von K. Ichihara u. I. Taniguchi)

Die Durchblutung wurde unter den gleichen Bedingungen ausgeführt, wie oben angegeben, mit in Tabelle VIII angegebenen Resultaten:

## IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Eine Mikrobestimmungsmethode der Oxyphenylbrenztraubensäure im Harn wurde hier beschrieben. Diese Methode gestattet, eine so geringe Menge Oxyphenylbrenztraubensäure, wie sie schon im normalen Harn auftritt, mit guter Genauigkeit zu bestimmen.

TABELLE VIII. (Leber u. Niere)

Nr.	Durchblutungsflüssigkeit			Zeit- dauer St	Harn- menge cem	Spez. Gew.	Jodsäurewert (2 cem)			K/R	Bemerkungen
	Blut cem	Ringer- Lösung cem	Zusatz				Gesamt-	Keto-	Rest-		
1.	100	400		1-2	28	1012	0,035	0,020	0,015	1,33	Aus dem Äther- extrakt des ganzen einstündigen Harns wurden nadelförmige Kristalle isoliert, die Millon-Reaktion gaben und bei 168°C schmolzen.
				2-3	42	1012	0,020	0,010	0,010	1,00	
2.	120	400	0,78 g <i>l</i> -Tyrosin	1-2	23	1012	0,135	0,065	0,070	0,93	
				2-3	22	1012	0,155	0,090	0,065	1,38	
3.	120	400	0,78 g <i>l</i> -Tyrosin	1-2	12	1012	0,110	0,050	0,060	0,83	
				2-3	12	1012	0,095	0,070	0,025	2,80	
4.	80	320	6,60 g <i>l</i> -Tyrosin	1-2	12	1012	0,080	0,030	0,050	0,60	Aus dem Äther- extrakt des ganzen einstündigen Harns wurden sandartige Kristalle isoliert, die Millon-u. FeCl <sub>3</sub> -Reakt. gaben.
				2-3	24	1012	0,100	0,060	0,040	1,50	
5.	90	360	0,675 g <i>dl</i> -Tyrosin	1-2	30	1014	0,140	0,095	0,045	2,11	
				2-3	32	1014	0,106	0,068	0,038	1,79	
6.	80	320	0,60 g <i>dl</i> -Tyrosin	1-2	21	1010	0,175	0,113	0,062	1,82	
				2-3	40	1010	0,075	0,048	0,027	1,78	
7.	80	320	0,60 g <i>dl</i> -Tyrosin	1-2	13	1012	0,115	0,080	0,035	2,31	
				2-3	21	1012	0,138	0,102	0,036	3,00	



TABELLE IX. (Niere)

Nr.	Durchblutungsflüssigkeit			Zeit- dauer St	Harn- menge cem	Spez. Gew.	Jodsäurewert (2 cem)			K/R	Bemerkungen
	Blut cem	Ringer- Lösung cem	Zusatz				Gesamt-	Keto-	Rest-		
1.	80	200		1	30	1011	0,025	0,015	0,010	1,50	
2.	60	200		1	25	1010	0,039	0,024	0,015	0,60	
3.	70	200	0,2 g l-Tyrosin	1	27	1010	0,058	0,023	0,035	0,66	
4.	50	200	0,3 g l-Tyrosin	1	16	1013	0,058	0,028	0,030	0,93	
5.	50	200	0,3 g l-Tyrosin	1	12	1012	0,050	0,024	0,026	0,92	
6.	50	200	0,2 g dl-Tyrosin	1	16	1010	0,088	0,060	0,028	2,14	Aus dem Äther- extrakt isolierte sandartige Kristalle gaben Millon- und FeCl <sub>3</sub> -Reakt.
7.	60	200	0,3 g dl-Tyrosin	1	23	1010	0,148	0,085	0,063	1,35	
8.	50	200	0,3 g dl-Tyrosin	1	34	1010	0,115	0,083	0,032	2,59	

Nach unseren wiederholten Untersuchungen des Harns wird die genannte Ketosäure im physiologischen Zustand bei Pflanzenfressern relativ mehr ausgeschieden als bei Fleischfressern.

Wenn man unsere Resultate, die nach Tyrosinverfütterung gewonnen wurden, näher betrachtet, so kann man wohl kaum einen Zweifel hegen, dass das *L*-Tyrosin im Tierkörper bei seiner physiologischen Spaltung vorwiegend über Oxyphenylmilchsäure umgewandelt wird. Was den sich hierbei abspielenden Desaminierungsvorgang betrifft, so halten wir die Hydrolyse für wahrscheinlich, insbesondere auf Grund des Resultates Wunderlys (1932), welches beweist, dass die Desaminierung der Aminosäuren in Gegenwart einer Kohle hydrolytisch vor sich geht.

Ferner ergibt sich aus unseren Untersuchungen, dass die nichtnatürlichen Aminosäuren sowie ebenfalls eine natürliche, wenn die letztere in einer grossen Menge einverleibt wird, hauptsächlich auf oxydativem Wege über Ketosäuren abgebaut werden, was schon lange von O. Neubauer und F. Knoop behauptet wurde.

Wir glauben also immerhin noch, dass die Aminosäuren im allgemeinen, wie vor etwa 10 Jahren von Y. Kotake sr. geäussert wurde, im Tierkörper zum Teil hydrolytisch zum Teil oxydativ desaminiert werden. Das Problem, ob die intramolekulare Desaminierung auch im Tierkörper stattfindet, was bei gewissen Mikroorganismen der Fall ist, kommt besonders bei Bildung der Urokaninsäure, der Imidazolakrylsäure, aus Histidin in Frage. Leider ist dies noch nicht ganz sicher aufgeklärt.

Die vorliegende Arbeit wurde uns möglich durch die Bereitstellung eines Stipendiums vom Unterrichtsministerium, wofür wir hiermit unseren aufrichtigsten Dank aussprechen.

#### LITERATUR.

- Chikano (1929): *Biochem. Zeitschr.*, **205**, 166.  
Kotake und Schüler (1923/25): *Hoppe-Seylers Zeitschr.*, **122** u. **143**.  
Kotake (1910): *Hoppe-Seylers Zeitschr.*, **69**, 409.  
Knoop u. Oesterlin (1925): *Hoppe-Seylers Zeitschr.*, **148**, 294.  
Krebs (1933): *Hoppe-Seylers Zeitschr.*, **217**, 191.  
Medes (1932): *Biochem. Journ.*, **26**, 917.

Neubauer (1909): Deutsch. Arch. f. Klin. Med., **95**, 211.

Nishigaki (1931): Mitt. d. Med. Ges. z. Osaka, **30**, 807.

Shambough, Lewis u. Tourtellote (1932): Journ. of Biol. Chem.,  
**92**, 494.

Wunderly (1932): Helv. Chim., **15**, 721.



## KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER BROMSTOFFWECHSEL.

### II. Über Beziehungen zwischen Blutbromgehalt und innerer Sekretion.

VON

TEIKICHI KURANAMI.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. S. Nakagawa,  
Kaiserliche Universität zu Sapporo, Japan.)*

(Eingegangen am 30. Juli 1933)

#### EINLEITUNG.

Toxopeus (1930) hat vor kurzem über den Einfluss von Schilddrüse und Hypophysis auf die Bromverteilung im Hundorganismus Versuche angestellt und klar nachgewiesen, dass das Brom sowohl bei Schilddrüsenfütterung als auch bei Schilddrüsenexstirpation am meisten in der Haut, dann in zweiter Linie in der Muskulatur gefunden wird, während es sich bei Injektionen von Hypophysenpräparaten gerade umgekehrt verhält. Auch ich habe schon in meiner ersten Mitteilung (1932) darauf aufmerksam gemacht, dass der Blutbromspiegel bei Japanerinnen im Zusammenhang mit der menstruellen Blutung eigentümlichen wellenartigen Schwankungen unterworfen wird: er zeigt nämlich während der Menstruationsperiode den höchsten Wert und sinkt dann allmählich in der intermenstruellen Periode bis zum konstanten Wert ab, um mit dem Beginn der Blutung plötzlich das Minimum zu erreichen. Schon dieses Versuchsergebnis allein hat mich vermuten lassen, dass der Bromgehalt des Blutes sicher unter dem Einfluss der inneren Sekretion stehen müsste, gerade wie beim Jodspiegel des Blutes. In Bezug auf Blutjod ist nämlich in unserem Laboratorium von Ishikawa (1927–28) sehr klar herausgestellt worden, dass das Blutjod sicher von der inneren Sekretion beeinflusst wird, und zwar im Sinne der Eppinger und Hess'schen Hypothese: d.h., Ovarium und Pankreas wirken, von dem Einfluss auf den



Blutjodspiegel aus betrachtet, hemmend, die Nebenniere dagegen befördernd auf die Schilddrüsentätigkeit ein.

Trotz dieser genauen Untersuchungen über Beziehungen zwischen Blutjodgehalt und innerer Sekretion liegen aber sowohl bei uns als auch im Auslande noch keine exakten Angaben über Blutbrom vor. Ich habe mir deswegen auf Veranlassung von Herrn Prof. Nakagawa die Aufgabe gestellt, die Beziehungen zwischen Blutbromspiegel und innerer Sekretion genau zu erforschen. Die Bestimmungen des Blutbroms erfolgten genau in derselben Weise wie in meiner vorigen Mitteilung.

#### KLINISCHER TEIL.

##### 1. Schwangerschaft und Blutbromspiegel.

In meiner ersten Mitteilung habe ich klargestellt, dass der physiologische Bromgehalt des Blutes beim weiblichen Geschlechte dem Einfluss der Menstruation unterworfen ist. Andererseits ist auch wohl bekannt, dass die Schwangerschaft auf verschiedene innersekretorische Vorgänge hochgradigen Einfluss ausübt, was schon allein daraus zu vermuten ist, dass der Nachweis von Hypophysenvorderlappenhormon im Harn fast ausnahmslos zur Frühdiagnose der Schwangerschaft dienen kann. Deswegen beabsichtigte ich zuerst zu untersuchen, wie die Schwangerschaft auf den Blutbromspiegel einwirkt. Ich habe zu diesem Zwecke von 27 Schwangeren in beliebigen Schwangerschaftsmonaten Blut entnommen und auf Brom analysiert; die dabei erhaltenen Werte sind in Tabelle I zusammengestellt.

Aus der Tabelle ist auf einen Blick ersichtlich, dass der Bromspiegel der Schwangeren ohne Ausnahme von der Schwangerschaft beeinflusst wird, und zwar hat er sogar immer einen höheren Wert als der physiologische maximale Wert bei japanischen Frauen, den ich in meiner vorigen Mitteilung mit 0,67 angegeben hatte. Wenn man aber die erhaltenen Werte genauer betrachtet, so wird man sogleich darauf aufmerksam, dass der Bromwert im Verlaufe der Schwangerschaft in eigentümlicher Weise beeinflusst wird. Er zeigt nämlich im zweiten Schwangerschaftsmonat einen leicht

TABELLE I.

Name	Alter	Datum d. Blutentnahme	Schwangersch- Monat	Blutbrom mg%	Durchschnitt mg%	Geburt
K. T.	25	18/II 1932	II	0,69	0,70	Pr.
W. Y.	20	27/VI „		0,72		Pr.
M. S.	37	20/VII „		0,70		Mult.
S. N.	28	10/VIII „	III	0,74	0,73	„
T. C.	25	27/V „		0,70		„
T. M.	27	19/VIII „		0,76		Pr.
M. K.	32	18/I „	IV	0,97	0,91	Mult.
U. M.	25	12/II „		0,92		Pr.
M. S.	21	21/V „		0,85		„
S. I.	27	16/II „	V	0,86	0,90	„
A. M.	25	13/V „		0,94		Mult.
Y. T.	24	15/VIII „		0,91		Pr.
K. H.	26	11/VIII „	VI	0,95	0,90	Mult.
M. M.	37	28/V „		0,83		„
H. H.	28	27/IX „		0,86		„
O. M.	28	22/VI „	VII	1,09	1,04	„
K. S.	20	23/VII „		0,99		Pr.
K. C.	23	1/VIII „		1,05		Mult.
K. S.	22	8/III „	VIII	0,87	0,87	Pr.
O. C.	36	1/VII „		0,87		Mult.
K. C.	29	30/VIII „		0,88		„
F. M.	25	16/VII „	IX	0,96	1,04	„
K. F.	30	18/VII „		1,11		„
K. K.	27	18/VIII „		1,06		„
O. Y.	25	12/VIII „	X	1,06	1,05	„
O. N.	24	13/IX „		1,10		Pr.
K. C.	23	8/X „		0,98		Mult.

Pr.—Primipara. Mult.—Multipara.

erhöhten Wert, durchschnittlich 0,70 mg %, steigt aber dem Fortschreiten der Schwangerschaft entsprechend, ständig höher an, um endlich gegen Ende der Schwangerschaft den maximalen Wert zu

TABELLE II.

Schwankungen des Bromspiegels des Blutes bei einer schwangeren Frau.

K. Y. 28

Datum der Blutentnahme	Schwangerschaftsmonat	Bromspiegel mg%	Bemerkungen
11/XII 1931	IV	0,95	Multipara.
7/I 1932	V	0,95	Letzte Menses:
5/II "	VI	1,03	31/VIII-3/IX.
12/III "	VII	1,22	Bromspiegel im Nabel-
13/IV "	VIII	1,44	schnurblut: 0,75 mg%
3/V "	IX	1,57	
16/V "	X	1,05	Geburt: 16/V 1932
19/V "	3 Tage n. Geb.	1,24	
6/VI "	3 Wochern .Geb.	0,62	

erreichen. Dieses Verhältnis ist in Tabelle II noch klarer herausgestellt, wo ich von einer Schwangeren mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft wiederholt Blut entnommen und analysiert habe. Es soll hier noch kurz erwähnt werden, wie sich der während der Schwangerschaft angestiegene Blutbromgehalt im Wochenbett verhält. Er zeigt, wie aus Tabelle II ersichtlich, 3 Tage nach der Entbindung einen noch hohen Wert, um schon 3 Wochen darnach bis zum physiologischen Wert herabzusinken.

Kurz zusammengefasst, wird also der Blutbromspiegel von der Schwangerschaft in beträchtlichem Masse beeinflusst, und zwar steigt er mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft immer mehr an und erreicht endlich gegen Ende derselben den höchsten Wert, um nach 3 Wochen im Wochenbett schon wieder bis zum normalen Wert herabzusinken.

## 2. Bromgehalt im Nabelschnurblut.

Nachdem ich den Einfluss der Schwangerschaft auf den Bromspiegel des Mutterblutes festgestellt hatte, habe ich noch nachträglich untersucht, wie sich das Brom im Nabelschnurblut der Neugeborenen verhält. Wie aus Tabelle III ersichtlich ist, zeigt es ohne Zweifel einen höheren Wert als den bei erwachsenen

TABELLE III.

Bromspiegel des Nabelschnurblutes der Neugeborenen.

Nr.	Datum	Bromspiegel mg%	Nr.	Datum	Bromspiegel mg%
1	16/V '32	0,75	12	14/VII '32	0,74
2	26/V „	0,74	13	„ „	0,76
3	31/V „	0,74	14	21/VII „	0,77
4	8/VI „	0,74	15	24/VII „	0,76
5	11/VI „	0,76	16	26/VII „	0,77
6	17/VI „	0,74	17	31/VII „	0,75
7	„ „	0,73	18	1/VIII „	0,78
8	30/VI „	0,77	19	8/VIII „	0,74
9	3/VII „	0,74	20	14/VIII „	0,78
10	5/VII „	0,75	21	22/VIII „	0,76
11	7/VII „	0,74	22	26/VIII „	0,74

Durchschnitt: 0,75 mg%

Männern und Frauen durchschnittlichen; es beträgt nämlich 0,73–0,78 mg %, durchschnittlich 0,75 mg %; es soll hier aber nicht unerwähnt bleiben, dass dieser Wert weit unterhalb des Bromgehaltes der Kreissenden liegt. Es ist deswegen kein Zusammenhang zwischen dem Bromgehalt im Blute der Kreissenden und der Neugeborenen zu konstatieren; sie sind vollkommen voneinander unabhängig. Dieser hohe Bromspiegel bei Neugeborenen ist nicht ohne Interesse, wenn man ihn mit der möglichen Schwankung des Bromspiegels nach dem Lebensalter vergleichend betrachtet, worüber in naher Zukunft genau berichtet werden soll.

### 3. Schilddrüse und Bromspiegel.

#### a) Blutbrom bei Struma simplex.

Veil (1925) und Ishikawa (1927–28) in unserem Laboratorium haben ganz unabhängig von einander nachgewiesen, dass der Blutjodgehalt bei Struma simplex auffallend reduziert ist. Bei dieser Krankheit gibt es aber in Bezug auf Blutbrom keine einzige Angabe in der wissenschaftlichen Literatur. Ich habe nun an vier an Struma simplex Erkrankten sechsmal das Blut auf Brom

analysiert und konnte konstatieren, dass der Blutbromgehalt bei dieser Krankseits im Vergleich mit dem bei Gesunden sicher reduziert ist; er beträgt nämlich bloss 0,47–0,51 mg%. Ich hatte auch direkt nach der Beendigung der Menstruation Gelegenheit den Blutbromgehalt zu untersuchen, wo man sonst viel höhere Werte erwarten sollte; er hatte aber nur den minimalen Wert bei gesunden Frauen. (Tabelle IV.)

TABELLE IV.  
Blutbromspiegel bei Struma simplex.

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Datum	Blutbrom mg %	Bemerkungen
1	K. K.	30	♀	7/XI '31	0,50	Amenorrhoe seit III
2	H. T.	21	♀	4/XII „ 15/XII „	0,51 0,40	Menses: 28/XI–1/XII
3	T. F.	23	♀	13/I '32 23/IV „	0,47 0,49	Menses: 4–7/I Menses: 18–21/IV
4	Y. T.	19	♀	16/I „	0,47	Amenorrhoe

*b) Blutbrom bei Morbus Basedowii.*

Es ist wohl bekannt, dass bei Morbus Basedowii der Blutjodgehalt immer stark ansteigt. In Bezug auf das Blutbrom selbst sind erst neuerdings einige Angaben gemacht worden: Roman (1929) hat bei Basedowkranken den Blutbromgehalt als 0,77 mg %, Schneider (1931) als 795  $\gamma$  % und neuerdings Friz Ewer (1932) bei sechs Basedowkranken als durchschnittlich 940  $\gamma$  % angegeben. Da Schneider und Ewer mit Hilfe der Pincussen-Romanschen Bestimmungsmethode als den normalen Bromspiegel 1317  $\gamma$  % resp. 1 mg % angeben, so sind die drei Autoren darin völlig einig, dass bei Basedow immer ein reduzierter Bromspiegel im Blute zu konstatieren ist. Andererseits hat Tanino (1931) Schilddrüsenerkrankungen nach dem Kolloidgehalt einzuteilen versucht und ist zum Schlusse gelangt, dass der Quotient zwischen Brom und Jod in den an Kolloid armen Drüsenteilen viel kleiner ist als in den Kolloid mässig oder sehr reichlich enthaltenden



Partien. Dieser Quotient soll nach ihm bei Basedowkranken auffallend klein sein. Unabhängig von diesen Angaben habe ich bei sechs Basedowkranken das Blutbrom analysiert, um den Zusammenhang zwischen Bromspiegel und Schilddrüse zu erörtern; die Resultate sind in Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V.  
Blutbromspiegel bei Morbus Basedowii.

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Datum	Brommenge mg %	Grundumsatz	Bemerkgn.
1	I. I.	34	♂	22/VIII '30	1.25	+59%	
2	H. R.	22	♂	5/V '31	0.71	+14 „	Blutjod: 20 %
3	T. W.	47	♀	9/VII „	0.78	+44 „	
4	T. S.	19	♀	1/VIII „	0.76	+29 „	Menses: 5-8/VII, 2/VIII
				3/VIII „	0.73		
5	M. T.	40	♀	26/XI „	0.78	+72 „	
6	S. K.	26	♀	„ „	0.78	+65 „	Menses: Ende Okt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist der Bromspiegel bei Morbus Basedowii ausnahmslos erhöht; es soll hier aber auch nicht unerwähnt bleiben, dass der Grad der Bromspiegelerhöhung nicht immer mit der Erhöhung des Grundumsatzes parallel läuft. Aus diesen Resultaten kann jedenfalls geschlossen werden, dass die Schilddrüse einen deutlichen Einfluss auf den Bromspiegel auszuüben imstande ist, und zwar in erhöhendem Sinne.

#### 4. Blutbrom und Diabetes mellitus.

Ob das Blutbrom von der inneren Sekretion des Pankreas überhaupt beeinflusst wird oder nicht, darüber liegt sowohl bei uns als auch im Auslande keine einzige Angabe vor. Es ist aber sehr schwer, bei gesteigerter innerer Sekretion des Pankreas diesen Zusammenhang klinisch zu erforschen; denn wir treffen solche Kranke bloss zufällig und äusserst selten. Deswegen habe ich bei Diabetes mellitus, wo in der grössten Mehrzahl Hypofunktion des insulären Apparates des Pankreas angenommen wird, das Brom

TABELLE VI.  
Blutbromspiegel bei Diabetes mellitus.

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Datum	Bromspiegel	Bemerkungen
1	M. F.	57	♀	7/IV '32	1,01	{ Beschränkte Diät { Harnzucker (-)
2	K. M.	67	♂	19/X „	0,96	{ Reis (gekocht 360 g) { Harnzucker (##)
3	H. T.	28	♂	28/XI „	0,92	Harnzucker 120 g
				7/XII „	0,85	„ 44,4 g
4	N. T.	55	♂	2/XII „	0,93	„ 10 g
				6/XII „	0,86	„ 3 g
5	T. M.	32	♀	22/XII „	0,88	Harnzucker (##)
6	U. K.	57	♂	7/I '33	0,88	„ (##)
7	Y. K.	44	♂	8/II „	0,78	{ Harnzucker 8,3 g { Insulin 20 E.
8	U. Y.	49	♂	8/III „	0,82	Harnzucker (##)
9	N. T.	48	♂	18/III „	0,81	„ (##)

im Blute analysiert und wollte daraus irgendeinen Zusammenhang zwischen beiden erforschen. Aus den Resultaten, welche ich in Tabelle VI zusammengestellt habe, lässt sich ersehen, dass bei dieser Krankheit ohne Ausnahme ein auffallend hoher Gehalt an Blutbrom gefunden worden kann. Dieses Ergebnis lässt uns fast mit Sicherheit erwarten, dass die Hyperfunktion des insulinären Apparates des Pankreas einen vermindernden Einfluss auf das Blutbrom ausüben dürfte. Darauf, ob diese Annahme tatsächlich berechtigt ist, werde ich im folgenden tierexperimentellen Teil zurückkommen.

#### TIEREXPERIMENTELLER TEIL.

In bezug auf das Verhalten der innersekretorischen Drüsen zum Blutbrom habe ich schon oben genau erwähnt und dabei klargestellt, dass die innersekretorischen Krankheiten, die ich an Krankenmaterial zu untersuchen Gelegenheit hatte, einen deutlichen Einfluss auf den Blutbromspiegel auszuüben imstande sind. Es bleiben aber noch zu viele Lücken übrig, als dass man einen sicher begründeten Begriff über die Beziehungen zwischen Blut-

bromspiegel und innersekretorischen Drüsen überhaupt gewinnen könnte. Diese Lücken wollte ich durch Tierexperimente ausfüllen, indem ich einerseits durch Exstirpation der betreffenden Drüsen Hypofunktion derselben, und anderseits durch Injektion innersekretorischer Sekrete Hyperfunktion derselben hervorrief.

### 1. Kontrollversuche an Hunden.

Bevor ich zur Beschreibung meiner tierexperimentellen Resultate übergehe, scheint mir notwendig, zur Kontrolle vorzuschicken, wie sich der Blutbromspiegel beim Hunde verhält, und weiter wie er durch Blutentnahme beeinflusst wird. Ich habe nun Blut von 13 Hunden 47mal auf Brom analysiert (Tabelle VII); dabei resultierte, dass der Bromspiegel auch bei diesem Tier gerade

TABELLE VII.  
Bromspiegel bei gesunden Hunden.

Nr.	Geschlecht	Körpergewicht	Bromspiegel (mg%) und Datum d. Blutentnahme		
1	♀	10,3	0,55 (10/V), 0,55 (31/V), 0,63 (8/VII), 0,62 (6/IX), 0,64 (5/X)	0,61 (19/V), 0,57 (8/VI), 0,63 (17/VII), 0,62 (17/IX)	0,59 (24/V), 0,62 (3/VII), 0,65 (4/VIII), 0,65 (27/IX)
2	♀	9,7	0,57 (4/VI), 0,60 (26/VI)	0,55 (12/VI),	0,57 (18/VI),
3	♀	19,9	0,60 (21/VII),	0,63 (26/VII),	0,65 (21/VIII)
4	♀	9,5	0,61 (25/VIII), 0,61 (5/X)	0,60 (1/IX),	0,60 (22/IX),
5	♀	12,0	0,61 (14/XII),	0,62 (9/I),	0,63 (11/I)
6	♀	7,6	0,59 (22/XII)		
7	♀	12,0	0,62 (20/I), 0,60 (15/II),	0,61 (3/II), 0,60 (21/II),	0,61 (9/II), 0,61 (23/II)
8	♀	9,6	0,61 (25/II)		
9	♂	11	0,62 (15/III)		
10	♀	11	0,62 (16/IV),	0,62 (19/IV),	0,62 (7/VI)
11	♀	14,7	0,62 (25/V), 0,62 (2/VII)	0,62 (31/V),	0,63 (14/VI),
12	♂	18	0,64 (6/V),	0,64 (8/V),	0,64 (16/V)
13	♂	18	0,69 (14/VI)		

Maximum: 0,69,

Minimum: 0,55,

Durchschnitt: 0,61 mg%

wie beim Menschen in ziemlich konstanter Höhe steht. Das Maximum betrug dabei 0,69, das Minimum 0,55 und der Durchschnitt 0,61 mg %; obwohl der Bromspiegel bei einzelnen Tieren geringen individuellen Schwankungen unterworfen ist, schwankt er meistens um 0,60 mg %. Es ist hier auch noch hinzuzufügen, dass er bei mehreren Analysen zu verschiedenen Zeiten fast auf einem konstanten Wert fest blieb. Vergleicht man nun diese Zahlen mit denen des Menschen, so stellt sich heraus, dass kein merklicher Unterschied zwischen beiden zu konstatieren ist.

Dann habe ich an ein und demselben Hunde unter Blutentnahme die stündlichen Schwankungen des Bromspiegels geprüft (Tabelle VIII) und konnte konstatieren, dass er fast auf einer konstanten Höhe blieb, indem er nur innerhalb der technischen Fehlergrenzen schwankte.

TABELLE VIII.  
Einfluss der Blutentnahme auf den Bromspiegel.

Hund		Bromspiegel (mg%)					Durchschnitt
		Vor	1 Std.	2 Std.	3 Std.	4 Std.	
1	10,3	0,59	0,59	0,60	0,57	0,53	0,58
2	9,7	0,57	0,57	0,58	0,58	0,60	0,58
3	19,9	0,60	0,58	0,63	0,61	0,63	0,61

## 2. Injektion des Thyroxins.

Baldauf und Pincussen (1930) haben durch subkutane Injektion von Thyroxin einen erhöhten Blutjodspiegel nachgewiesen und noch festgestellt, dass der Blutbromspiegel in der Mehrzahl der Fälle im Anfangsstadium zunimmt. Im Gegensatz dazu soll nach Fritz Ewer (1932) nach intravenöser Injektion derselben Substanz keine Zunahme an Blutbrom wahrgenommen, sondern sein minimaler Wert in drei Fällen nach 2-4 Stunden und in einem Falle erst nach 24 Stunden erreicht worden sein. Ich habe nun Hunden 1 ccm Thyroxin unter die Bauchhaut injiziert und jeden Tag das Blut analysiert. Das Resultat (Tabelle IX) zeigte klar, dass das Thyroxin, wenn auch am zweiten Tag eine

TABELLE IX.  
Thyroxininjektion und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Bromgehalt (mg%)	
	Hund I 11,2 kg	Hund IV 11,4 kg
Vor	0,65	0,60
1 Tage	0,61	0,58
2 Tage	0,72	0,72
3 Tage	0,65	0,63
4 Tage	0,62	0,63
5 Tage	0,64	0,62

ganz geringe Erhöhung des Bromspiegels bemerkt wurde, doch im grossen und ganzen keinen auffallenden Einfluss auszuüben scheint. Ich habe aber das Blut auch in Intervallen von einigen Stunden bis zu 24 Stunden nach Thyroxininjektion auf Brom analysiert und konnte diesmal ohne Ausnahme eine deutliche Beeinflussung des Bromspiegels feststellen (Tabelle X). Der Bromspiegel erreicht nämlich seinen höchsten Wert nach zwei Stunden und steigt schon nach 6 Stunden wieder herab, um nach 24 Stunden wieder auf den normalen Wert zurückzukommen.

TABELLE X.  
Thyroxin und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Bromgehalt (mg%)			
	Hund VII 12 kg ♀	Hund VIII 10 kg ♀	Hund IX 11 kg ♂	Durchschnitt
Vor	0,60	0,60	0,62	0,61
2 Std.	1,09	1,06	1,02	1,06
6 Std.	0,75	0,88	0,86	0,83
12 Std.	0,67	0,63	0,72	0,67
24 Std.	0,65	0,61	0,65	0,64

Dieses Ergebnis zeigt uns einwandfrei, dass die Thyroxininjektion während einiger Stunden auf den Bromspiegel erhöhend einwirken kann.



### 3. Injektion von Insulin.

Es liegt noch keine einzige Angabe über die Beziehung zwischen Blutbromspiegel und Insulin vor. Ich habe, wie oben erwähnt, aus den Resultaten an Diabeteskranken angenommen, dass die Hyperfunktion des insulären Apparates des Pankreas vielleicht auf den Bromspiegel herabdrückend einwirken würde. Um dieser Annahme eine sichere experimentelle Grundlage zu geben, habe ich nun Hunden 30 Einheiten Insulin unter die Bauchhaut injiziert und gefunden, dass der Bromspiegel nach 30 Minuten leicht absteigt, nach einer Stunde am tiefsten steht und dann allmählich aufsteigt, um nach 3 Stunden wieder die normale Höhe zu erreichen. Die obige Annahme hat sich deswegen als berechtigt erwiesen. Die eigentliche Wirkung des Insulins ist aber, wie wohl bekannt, die die Hypoglykämie hervorrufende. Man wird deswegen vielleicht vermuten, dass die den Bromspiegel herabdrückende Wirkung des Insulins durch die Hypoglykämie bedingt sei. Ich habe nun, um eine mögliche Beziehung zwischen Bromspiegel und Hypoglykämie des Insulins zu erforschen, den Blutzucker mitbestimmt. Es geht aber aus den Resultaten hervor, dass die beiden nicht gut zusammenfallen (Tabelle XI). Der Blutzucker geht nämlich immer mehr herab, während der Bromspiegel schon nach zwei Stunden aufzusteigen beginnt. Es lässt sich deswegen schliessen, dass nicht die Hypoglykämie selbst einen niedrigen Bromspiegel hervorruft, sondern dass die beiden Phänomene durch gesonderte Wirkungen des Insulins bedingt sind.

TABELLE XI.  
Insulininjektion und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Blutbrom (mg%)		Blutzucker (mg%)		Durchschnitt	
	Hund I 10,3 kg	Hund II 9,7 kg	Hund I ♀	Hund II ♀	Blutbrom	Blutzucker
Vor	0,55	0,57	85	80	0,56	83
1/2 Std.	0,49	0,48	58	58	0,49	58
1 Std.	0,37	0,43	46	47	0,40	47
2 Std.	0,58	0,50	43	46	0,54	45
3 Std.	0,56	0,61	38	37	0,59	38

4. *Bromspiegel und Ovarium.*

Über das Verhältnis zwischen Bromspiegel und Ovarialfunktion liegt keine einzige Angabe vor: das ist noch ein völlig unberührt gebliebenes Gebiet. Ich habe als erster in der vorigen Mitteilung einen bedeutenden Einfluss der Menstruation auf den Bromspiegel einwandfrei nachgewiesen und deshalb vermutet, dass ein inniger Zusammenhang zwischen beiden vorhanden sein müsse. Ich habe nun Versuche an Hunden angestellt, um dieser Vermutung noch eine sichere Grundlage zu geben. Subkutan habe ich nämlich Gynandol — ein japanisches Ovarialhormonpräparat — in einer Menge von 1 ccm (50 Einheiten) einverleibt; der Bromspiegel steigt, wie aus Tabelle XII klar ersichtlich ist, eine halbe bis eine Stunde nach Injektion sehr steil herab, steigt aber schon nach 2 Stunden wieder auf, um nach 3 Stunden wieder den Anfangswert zu erreichen.

TABELLE XII.  
Gynandolinjektion und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Blutzucker (mg%)			
	Hund I	Hund II	Hund III	Durchschnitt
Vor	0,55	0,61	0,55	0,57
1/2 Std.	—	0,37	—	0,37
1 Std.	0,39	0,27	0,34	0,33
2 Std.	0,47	0,44	0,49	0,47
3 Std.	0,55	0,62	0,64	0,60

Nun habe ich das Verhalten des Bromspiegels bei der Hypofunktion der Ovarien zu untersuchen versucht; beide Ovarien wurden an 3 Hunden völlig exstirpiert, und das Blutbrom wurde vom nächsten bis zum 14. Tage bestimmt. Wie aus Tabelle XV hervorgeht, steigt der Bromspiegel vom 4. Tage an auf und erreicht das Maximum am 8. Tage, um dann plötzlich abzufallen; am 10. Tage beträgt er bloss den Anfangswert und behält nachher eine konstante Höhe.

Aus diesen Resultaten lässt sich fast sicher schliessen, dass

die Hyperfunktion der Ovarien auf den Bromspiegel des Blutes nur herabsetzend, die Hypofunktion derselben aber im Gegensatz dazu nur erhöhend einwirken kann.

### 5. Bromspiegel und Hoden.

Nachdem festgestellt wurde, dass das Ovarium mit dem Bromspiegel in sehr inniger Beziehung steht, ist es auch nicht ganz ohne Interesse zu wissen, wie sich der Hoden bei dem Bromstoffwechsel verhält. Zu diesem Zwecke habe ich an männlichen Hunden die Hoden beiderseits entfernt und den Bromspiegel 14. Tage lang analysiert (Tabelle XVI). Er steigt dabei vom 4. Tage an merklich an und erreicht das Maximum am 6.-8. Tage, um dann absteigend am 10. Tage schon bis zum Anfangswert herunterzusinken. Dieses Verhältnis ist ganz dasselbe wie bei der Ovarieneextirpation. Der Ausfall der inneren Sekretion des Hodens wirkt also auf den Bromspiegel erhöhend ein; und danach kann man wohl annehmen, dass das innere Sekret des Hodens wahrscheinlich auf den Bromspiegel herabdrückend einwirkt, gerade wie das Ovarialhormon. Diese Annahme könnte man exakt beweisen, wenn isoliertes Hodenhormon einverleibt werden könnte. Leider stand mir dieses Normon nicht zur Verfügung.

TABELLE XIII.  
Puberogeninjektion und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Blutbrom (mg%)			
	Hund V 12 kg ♀	Hund VI 7,6 kg ♀	Hund VII 12 kg ♀	Durchschnitt
Vor	0,61	0,59	0,61	0,60
1/2 Std.	—	0,37	0,38	0,38
3/4 Std.	0,40	—	—	0,40
1 Std.	—	0,45	0,41	0,43
1,5 Std.	0,64	—	—	0,64
2 Std.	0,71	0,70	0,68	0,70
3 Std.	0,78	0,73	0,92	0,81
5 Std.	0,56	0,64	0,73	0,64
7 Std.	0,60	0,57	0,66	0,61

TABELLE XIV.

Puberogeninjektion bei männlichen Hunden und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Blutbrom (mg%)		
	Hund XII 18 kg	Hund XIII 18 kg	Durchschnitt
Vor	0,64	0,69	0,67
1/2 Std.	0,39	0,53	0,46
1 Std.	0,45	0,66	0,56
2 Std.	0,68	0,80	0,74
3 Std.	0,75	0,95	0,85
5 Std.	0,68	0,81	0,75
7 Std.	0,66	0,71	0,69

6. *Bromspiegel und Hypophyse.*

Oben habe ich schon erwähnt, dass der Bromspiegel des Blutes bei Frauen durch die Schwangerschaft sehr intensiv beeinflusst wird, und zwar in erhöhendem Sinne. Andererseits ist uns die Beeinflussbarkeit der Hypophyse durch die Schwangerschaft sehr wohl bekannt, insbesondere seit der Entdeckung der biologischen Schwangerschaftsdiagnose nach Zandek-Aschheim. Aus diesen Tatsachen lässt sich wohl vermuten, dass die Hypophyse auch auf den Bromspiegel irgendeinen Einfluss auszuüben imstande sein werde. Ich habe nun Untersuchungen in dieser Richtung angestellt, indem ich den Vorderlappen und den Hinterlappen der Hypophyse getrennt behandelte.

a) *Bromspiegel und Hypophysenvorderlappenhormon.*

Ich habe zuerst 3 weiblichen Hunden 1 ccm von Puberogen — einem japanischen Hormonpräparat aus Hypophysenvorderlappen — unter die Bauchhaut einverleibt. Der Bromspiegel schwankte dabei in eigentümlicher Weise (Tabelle XIII). Er sinkt nämlich 30 bis 60 Minuten nach der Injektion deutlich herab und kehrt nach 90 Minuten wieder bis zum Anfangswert zurück; es folgt dann wieder eine auffallende Erhöhung, deren Maximum in die 3. Stunde fällt, und die in der 5. Stunde wieder zur Norm zurückkehrt. Man sieht also wellenförmige Schwankungen des Bromspiegels nach

Puberogeninjektion, welche in zwei Phasen einzuteilen sind.

Es interessierte mich nun zu wissen, wie sich das Hormon des Hypophysenvorderlappens bei männlichen Hunden verhalten werde. Ich habe daher an männlichen Hunden die gleichen Versuche angestellt wie an den weiblichen. Das Resultat war eben dasselbe wie bei den weiblichen Hunden (Tabelle XIV): man sah wellenförmige Schwankungen des Bromspiegels. Einer initialen Erniedrigung des Bromspiegels folgte eine auffallende Erhöhung desselben nach. Das zeitliche Verhalten der Schwankungen ist auch gleich wie bei den weiblichen Hunden.

TABELLE XV.

Einfluss der Ovariumexstirpation und nachheriger Puberogeninjektion auf den Bromspiegel.

Zeit nach Operation	Bromspiegel (mg%)			
	Hund VII 12 kg	Hund X 11 kg	Hund XI 14,7 kg	Durchschnitt
Vor	0,61	0,62	0,63	0,62
2 Tag.	0,56	0,60	0,60	0,59
4 Tag.	—	0,69	0,66	0,68
6 Tag.	0,71	0,77	0,69	0,72
8 Tag.	0,75	—	0,78	0,77
10 Tag.	0,61	0,63	0,62	0,62
12 Tag.	0,62	—	0,63	0,62
14 Tag.	0,61	0,63	0,62	0,62
Zeit nach Injektion	Puberogen 1 cem (10 M. E.) injiz. 18-19 Tage nach Ovariumexstirpation.			
Vor	0,61	0,62	0,62	0,62
1/2 Std.	0,45	0,45	0,44	0,45
1 Std.	0,68	0,64	0,65	0,62
2 Std.	0,98	0,74	0,82	0,85
3 Std.	0,99	0,81	0,91	0,90
5 Std.	1,06	0,98	0,95	1,00
7 Std.	1,14	1,17	1,00	1,10
12 Std.	0,79	0,80	0,80	0,80
24 Std.	0,63	0,67	0,63	0,64



Um diese eigentümlichen Schwankungen noch genauer zu analysieren, habe ich in dieser Weise noch weitere Versuche angestellt. Dem Hunde wurden beide Hoden resp. beide Ovarien völlig entfernt, und nachdem der Einfluss der Exstirpation der Organe auf den Bromspiegel vorübergegangen war, habe ich 1 ccm von Puberogen subkutan injiziert. Bei dieser Versuchsweise verhält sich die Wirkung des Puberogens etwas anders als bei den unkastrierten Hunden. Der Bromspiegel sinkt nämlich zwar in der ersten halben Stunde in sehr geringem Grade ab, erreicht aber schon in der ersten Stunde wieder seinen Anfangswert. Dann folgt eine auffallende Erhöhung, deren Maximum in der 7. Stunde erreicht wird. Nach 12 Stunden steigt er wieder herab, um nach 24 Stunden fast den normalen Wert zu erreichen (Tabelle XV und XVI). Die Art und Weise der Schwankungen und das zeitliche Verhalten derselben sind bei den beiden Geschlechtern ganz gleich. Wenn man diese Schwankungen des Bromspiegels mit denen, welche in den Versuchen mit intakten Hoden oder Ovarien festgestellt sind, vergleicht, so fällt auf, erstens, dass die initiale Herabsetzung des Bromspiegels durch Puberogeninjektion bei den Fällen mit Ovarialexstirpation viel geringer und kurzdauernder ist, zweitens, dass die nachfolgende Erhöhung viel hochgradiger ist und längere Zeit andauert. Man scheint deshalb berechtigt zu sein, zu schliessen, dass die eigentliche Wirkung des Puberogens auf den Bromspiegel in der Erhöhung desselben besteht. Diese Wirkung wird wahrscheinlich bei den Hunden mit intakten Ovarien oder Hoden teilweise gehemmt.

*b) Bromspiegel und Hypophysenhinterlappenhormon.*

Nachdem die innige Beziehung zwischen Bromspiegel und Vorderlappenhormon festgestellt war, war es auch von Interesse, den Einfluss des Hinterlappenhormons zu erforschen. Es liegen auch auf diesem Gebiete keine Angaben vor. Ich habe nun den Hunden 1 ccm von Atonin — einem japanischen, dem Pituitrin ähnlichen Hinterlappenhormon — subkutan injiziert. Es zeigte sich (Tabelle XVII), dass der Bromspiegel nach 30 Minuten herabsinkt und nach einer Stunde sein Minimum erreicht, um dann aufsteigend

TABELLE XVI.

Einfluss der Hodenentfernung und nachheriger Puberogeninjektion  
auf den Bromspiegel.

Zeit nach Operation	Blutbrom (mg%)		
	Hund XII	Hund XIII	Durchschnitt
Vor	0,64	0,69	0,67
2 Tage.	0,63	0,67	0,65
4 „	0,71	0,78	0,75
6 „	0,75	0,84	0,80
8 „	0,75	0,84	0,80
10 „	0,63	0,66	0,65
12 „	0,64	0,69	0,67
14 „	0,64	0,69	0,67
Zeit nach Injektion	Puberogen 1 ccm subkutan injiziert 18 Tage nach Hodenexstirpation		
Vor,	0,64	0,69	0,67
1/2 Std.	0,45	0,58	0,53
1 „	0,65	0,69	0,67
2 „	0,80	0,85	0,83
3 „	0,85	0,96	0,91
5 „	1,00	1,01	1,01
7 „	1,12	1,12	1,12
12 „	0,85	0,93	0,89
24 „	0,69	0,70	0,70

in der 3. Stunde wieder zu seinem Anfangswert zu gelangen. Das Hinterlappenhormon scheint also einen hemmenden Einfluss auf den Bromspiegel auszuüben.

#### 7. Bromspiegel und Nebenniere.

Aus der wohlbekannten Tatsache, dass zwischen Nebenniere einer- und Schilddrüse und Pankreas andererseits ein inniger Zusammenhang besteht, ist vielleicht irgendein Einfluss der Nebenniere auf den Bromspiegel zu erwarten: es wurde ja schon oben bewiesen, dass die letzteren beiden den Bromspiegel auffallend beeinflussen. Ich habe deshalb 3 Hunden 1 ccm von Adrenalin

TABELLE XVII.  
Atonininjektion und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Bromspiegel (mg%)			
	Hund I 10,7 kg ♀	Hund X 11 kg ♀	Hund XI 14,7 kg ♀	Durchschnitt
Vor	0,63	0,62	0,62	0,62
1/2 Std.	0,58	0,51	0,58	0,56
1 „	0,35	0,45	0,33	0,38
2 „	0,44	0,50	0,45	0,48
3 „	0,58	0,59	0,59	0,59

TABELLE XVIII.  
Adrenalininjektion und Bromspiegel.

Zeit nach Injektion	Bromspiegel (mg%)				
	Hund I 10,2 kg ♀	Hund I	Hund I	Hund IV 9,7 kg ♀	Durchschnitt
Vor	0,57	0,62	0,63	0,60	0,61
1/2 Std.	0,49	0,47	0,56	0,47	0,50
1 „	0,69	0,73	0,68	0,69	0,70
2 „	0,61	0,64	0,64	0,65	0,64
3 „	0,60	0,60	0,64	0,62	0,62

TABELLE XIX.  
Einfluss der Pilocarpin- und Atropininjektion  
auf den Bromspiegel.

Zeit n. Injekt.	Pilocarpin 1 cem (1%)			Atropin 1 cem (0,1%)			
	Hund I	Hund IV	Durchschnitt	Hund I	Hund I	Hund IV	Durchschnitt
Vor	0,62	0,59	0,61	0,62	0,65	0,61	0,63
1/2 Std.	0,40	0,33	0,37	0,61	0,62	0,61	0,61
1 „	0,45	0,45	0,45	0,74	0,72	0,69	0,72
2 „	0,51	0,54	0,53	0,79	0,81	0,72	0,77
3 „	0,58	0,58	0,58	0,61	0,62	0,60	0,61

(0,1%) subkutan einverleibt; als Resultat ergab sich dabei: 30 Minuten nach Injektion fällt der Bromspiegel ziemlich auffallend ab und nach einer Stunde steigt er wieder bis zum maximalen Wert auf, um in der 2. oder 3. Stunde seinen Anfangswert erreichen. Das Hormon aus Nebennierenmark wirkt also wahrscheinlich auf den Bromspiegel erhöhend ein.

#### 8. *Bromspiegel und vegetative Nervengifte.*

Pilocarpin, ein vagusreizendes Mittel, bewirkte, den Hunden in einer Menge von 1 ccm einer 1%igen Lösung subkutan injiziert, nach 30 Minuten eine auffallende und maximale Erniedrigung des Bromspiegels; dann folgte eine allmähliche Steigerung desselben, und in der 3. Stunde schon eine Erholung bis zum Ausgangswert.

Atropin, ein vaguslähmendes Mittel, übte, wenn es den Hunden in einer Menge von 1 ccm einer 0,1%igen Lösung unter die Bauchhaut einverleibt wurde, einem ganz gegenteiligen Einfluss aus; der Bromspiegel erreichte sein Maximum in der 2. Stunde und kehrte schon in der 3. Stunde wieder zur Norm zurück.

Es lässt sich aus diesen Resultaten schliessen, dass Pilocarpin herabdrückend, Atropin dagegen erhöhend auf den Bromspiegel einwirken kann. Es wird nicht ohne Interesse sein, dass Pilocarpin einerseits und Atropin und Adrenalin anderseits auf den Bromspiegel ganz umgekehrt einwirken, wie auf andere biologische Vorgänge.

#### 9. *Einfluss der Injektion von Kochsalzlösung.*

Wenn man meine bisherigen tierexperimentellen Versuchsergebnisse noch etwas genauer nachsieht, so fällt es zuerst auf, dass jede Injektion von innersekretorischen Substanzen in der initialen Phase eine Erniedrigung des Bromspiegels zur Folge hat. Es ist deswegen sehr fraglich, ob die initiale Erniedrigung des Bromspiegels auf die eigentliche Wirkung der injizierten Substanzen zurückzuführen sei. Um diesen Umstand klarer zu machen, habe ich als Kontrollversuch 1 ccm von physiologischer Kochsalzlösung subkutan einverleibt und den Bromspiegel bestimmt. Wie aus Tabelle XX ersichtlich ist, stellte sich klar heraus, dass auch die

TABELLE XX.  
Injektion von Kochsalzlösung und Blutbrom.

Zeit nach Injektion.	Bromspiegel (mg%)			
	Hund VII	Hund VIII	Hund IX	Durchschnitt
Vor	0,61	0,61	0,60	0,61
1/2 Std.	0,48	0,55	0,49	0,51
1 „	0,61	0,62	0,60	0,61
2 „	0,61	0,60	0,60	0,60
3 „	0,61	0,61	0,60	0,61

Injektion von Kochsalzlösung allein nach 30 Minuten einen erniedrigten Bromspiegel hervorruft. Nach einer Stunde kehrt er aber bis zum normalen Wert zurück, um nachher auf einem konstanten Niveau zu bleiben. Daraus geht hervor, dass die geringe initiale Erniedrigung des Bromspiegels nicht auf die eigentliche Wirkung der injizierten innersekretorischen Substanzen zurückzuführen ist, sondern durch die Injektion allein bedingt sein muss. Die eigentlichen Wirkungen der inneren Sekrete dürfen also erst nach den Ergebnissen nach dem Abklingen der initialen Erniedrigung beurteilt werden.

#### DISKUSSION.

Wenn man meine klinischen und tierexperimentellen Versuchsergebnisse überblickt, so kann wohl niemand das Vorhandensein inniger Beziehungen zwischen Blutbromspiegel und innerer Sekretion verneinen.

Man betrachte zuerst die Resultate an Schwangeren: Der Bromspiegel steigt schon am Anfang der Schwangerschaft über die Norm an und erreicht sein Maximum gegen Ende derselben. Dies ist ohne Zweifel durch die veränderten Wirkungen der innersekretorischen Drüsen während der Schwangerschaft zu erklären. Es ist uns ja wohl bekannt, dass der Hypophysenvorderlappen mit dem Beginn der Schwangerschaft seine Wirkung steigert, und dass sein Hormon während derselben in immer grösserer Menge im Blutserum und im Harn gefunden wird. Andererseits tritt aus



meinen Versuchen klar zutage, dass dieses Hormon auf den Bromspiegel enorm erhöhend einwirkt. Es ist aber auch nicht zu vergessen, dass während der Schwangerschaft nicht nur der Hypophysenvorderlappen, sondern auch Schilddrüse, Ovarium und viele andere innersekretorische Drüsen mit beeinflusst werden. Die Schilddrüse wirkt nun auf den Bromspiegel erhöhend, das Ovarium aber im Gegensatz dazu herabdrückend ein. Daraus ist wohl zu schliessen, dass der erhöhte Bromspiegel während der Schwangerschaft aus dem Zusammenspiel der Wirkungen der erhöhend wirkenden Hormone des Vorderlappens und der Schilddrüse einerseits und des herabdrückend wirkenden Ovarialhormons andererseits resultiert. Dabei spielen wohl auch noch viele andere Faktoren eine Rolle. Kurz gesagt, während der Schwangerschaft wirken die den Bromspiegel erhöhenden Faktoren in viel stärkerem Masse ein als die ihn herabdrückenden.

Im Wochenbett behält der Bromspiegel durch das Fortbestehen der Einflüsse der Schwangerschaft noch eine Zeit lang seinen erhöhten Wert, 3 Wochen nach der Entbindung kehrt er aber schon bis zum normalen Werte zurück, wahrscheinlich infolge Fortfalls der Wirkungen der innersekretorischen Drüsen, insbesondere des Hypophysenvorderlappens.

Auch im Nabelschnurblute von Neugeborenen habe ich konstant Brom nachgewiesen, allerdings viel weniger als im Mutterblute. Das zeigt uns, dass sich das Blut der Neugeborenen in Bezug auf den Bromspiegel von dem der Mütter vollkommen unabhängig verhält. Der Bromspiegel im Nabelschnurblute steht aber, im Verhältnis zu dem der Erwachsenen, viel höher. Dieses Verhältnis lässt uns vermuten, dass der Bromspiegel unter dem Einfluss des Lebensalters Schwankungen unterworfen wird, worüber ich noch in einer der nächsten Mitteilungen genau berichten werde.

Was die Schilddrüse anbelangt, so ist der Bromspiegel bei Struma simplex herabgesetzt, während er bei Morbus Basedowii erhöht ist. Man kann daher annehmen, dass die Hypofunktion der Schilddrüse herabdrückend, die Hyperfunktion derselben dagegen erhöhend auf den Bromspiegel einwirkt. Diese Annahme

wird auch durch meine Versuche unterstützt, welche zeigen, dass die subkutane Injektion von Thyroxin auf den Bromspiegel deutlich erhöhend einwirkt.

In Bezug auf das Pankreas habe ich bei Diabetes mellitus Kranken ohne Ausnahme erhöhten Bromspiegel konstatiert. Und da diese Krankheit meistens auf verminderte Sekretion des insulären Apparates zurückzuführen ist, so ist wohl anzunehmen, dass die Hyperfunktion desselben Apparates einen erniedrigten Bromspiegel zur Folge haben wird. Diese Annahme wurde durch meine tierexperimentellen Versuche, in denen die subkutane Injektion von Insulin ausnahmslos einen erniedrigten Bromspiegel hervorrief, als voll berechtigt erwiesen. Die innere Sekretion des Pankreas wirkt also auf den Bromspiegel des Blutes herabdrückend ein.

Die innere Sekretion der Ovarien und der Hoden übt nach meinen tierexperimentellen Versuchen einen herabdrückenden Einfluss auf den Bromspiegel aus. Im Gegensatz dazu wirkt das Hypophysenvorderlappenhormon stark erhöhend ein. Diese erhöhende Wirkung des Vorderlappens tritt noch viel auffallender an den Hunden zu Tage, denen Ovarien oder Hoden exstirpiert waren. Die beiden sexuell wirkenden Hormone, das Hormon des Hypophysenvorderlappens einerseits und der Ovarien und Hoden andererseits, wirken also auf den Bromspiegel ganz entgegengesetzt ein. Demgegenüber unterdrückt das Hormon des Hypophysenhinterlappens den Bromspiegel in geringer und kurzdauernder Weise.

Was die Hypophyse beim Bromhaushalte überhaupt anbelangt, so sind die Angaben, die neuerdings von einigen Autoren veröffentlicht wurden, sehr bedeutungsvoll. Vor einigen Jahren haben nämlich Bernhardt und Ucko (1926) mit Hilfe der Guareschischen Schwellenwertmethode nachgewiesen, dass die Hypophyse den bei weitem grössten Gehalt an Brom besitzt. Auch Uhlmann (1931) hat auf diese Tatsache hingewiesen und angegeben, dass die bisher bekannten Extrakte des Vorderlappens diesen erhöhten Bromgehalt nicht enthalten, sodass er auf eine neue noch unbekannte Funktion des Hypophysenvorderlappens hindeutet.

Zondek und Bier (1932) haben diesen Befund völlig bestätigt. Sie haben nämlich neben vielen Organen, insbesondere den verschiedenen Teilen des Grosshirns, die endokrinen Drüsen und vor allem zahlreiche Hypophysen analysiert. Indem sie etwa 150 Tierhypophysen von Bulle, Ochs, Kuh und Hund sowie etwa 60 menschliche Hypophysen untersuchten, haben sie den grössten Bromgehalt im Vorderlappen aufgefunden. Auch die Pars intermedia, die ja beim Menschen nicht, wohl aber beim Tier gesondert untersucht werden kann, enthalte einen gewissen Bromgehalt; der Hinterlappen zeige ihn nur in geringen Mengen. Nach ihren Angaben soll die Bromkonzentration in der Hypophyse Werte zeigen, die zwischen 15–30 mg % liegen, während die übrigen Organe etwa Werte von 1–2 mg % aufweisen. Auf Grund dieser Tatsachen haben sie angenommen, dass ein spezifisches Hormon, welches sie das Bromhormon nannten, im Vorderlappen vorhanden sein müsse, und behauptet, dass es ihnen gelang, ein solches eiweissfreies, bromhaltiges, wässriges Extrakt aus der Hypophyse zu isolieren. Sie geben aber nicht an, wie dieses Hormon auf den Bromspiegel im Blute einwirkt. Ich habe das Vorderlappenhormon, Puberogen, auf Brom analysiert, und dabei gefunden, dass die Bromkonzentration bloss etwa 2,2 mg% beträgt. Obwohl diese Konzentration ungefähr 4mal höher als die im Blute ist, so ist es doch schwer, eine spezifische Funktion des Vorderlappens im Bromhaushalte ohne weiteres auf dieses Brom zurückzuführen.

Wenn man nun diese Befunde der Autoren mit meinen Resultaten vergleicht, so wird wohl niemand verneinen, dass die Hypophyse, insbesondere der Vorderlappen, beim Bromhaushalte eine grosse Rolle spielt. Es ist aber hier noch unerwähnt geblieben, dass Zondek und Bier ein spezifisches Hormon im Vorderlappen annehmen, während ich in meinen Versuchen bloss mit einem im Handel befindlichen Vorderlappenhormon, welches zum Zwecke der Reizung der Ovarialfunktion dargestellt ist, arbeitete. Ich muss mir deswegen vorbehalten, zu der Frage Stellung zu nehmen, ob das von Zondek aus dem Vorderlappen isolierte Bromhormon mit dem von mir angewandten Vorderlappenhormon identisch sei, oder ob das Bromhormon im Puberogen gemischt sei. Es ist dabei nicht

ohne Interesse, dass das sogenannte Vorderlappenhormon, welches zur Zeit zur Reizung der Ovarialfunktion gebraucht wird, auch auf den Bromspiegel im Blute stark erhöhend einwirken kann.

Was die Wirkungen der vegetativen Nervengifte auf den Bromspiegel anbelangt, so wirken Pilocarpin herabdrückend, Atropin und Adrenalin aber erhöhend ein. Der Bromspiegel erhöht sich also bei der Vaguslähmung oder bei der Sympathikusreizung und erniedrigt sich bei der Vagusreizung.

Der Bromspiegel des Blutes behält seinen konstanten Wert bei den einzelnen Individuen und in verschiedenen Zeiten, abgesehen von den wellenförmigen Schwankungen bei Frauen unter dem Einfluss der menstruellen Blutungen. Dasselbe gilt auch bei den Hunden. Andererseits ist er unter dem Einfluss von verschiedenen Manipulationen, z. B. selbst bloss von Injektion physiologischer Kochsalzlösung, ziemlich labil. Es ist deswegen die initiale Erniedrigung des Bromspiegels bei Injektionen verschiedener Substanzen nicht auf die eigentliche Wirkung derselben zurückzuführen.

Kurz zusammengefasst, stehen die innersekretorischen Drüsen zum Bromspiegel in sehr inniger Beziehung. Die eine Gruppe wirkt erhöhend und die andere herabdrückend ein. Zu der ersteren Gruppe gehören Schilddrüse, Nebenniere und Hypophysenvorderlappen und zu der anderen Hoden, Ovarium, Pankreas, Hypophysenhinterlappen und die Vagusreizung. Dieses Verhältnis ist völlig dasselbe, wie es Ishikawa in unserem Laboratorium beim Blutjodspiegel bestätigt hatte. Er hat nämlich bewiesen, dass Schilddrüse und Nebenniere erhöhend, und Ovarium und Pankreas herunterdrückend auf den Blutjodspiegel einwirken. Durch Zusammenspiel dieser zahlreichen entgegengesetzt gerichteten Einflüsse bleibt der Bromspiegel des Blutes bei den gesunden Individuen auf einer konstanten Höhe; wenn aber diese innersekretorischen Drüsen in ihrer Koordination irgendwie gestört werden, so wird ein erhöhter oder ein erniedrigter Bromspiegel zu Tage treten. In diesem Sinne wird vielleicht der Bromspiegel in der Zukunft bei verschiedenen Krankheiten seine biologische Bedeutung gewinnen.



## ZUSAMMENFASSUNG.

1. In der Schwangerschaft erhöht sich der Bromspiegel des Blutes schon am Anfang derselben, steigt immer mehr mit deren Fortschreiten und erreicht endlich gegen Ende derselben seinen maximalen Wert.

2. Direkt nach der Entbindung behält er noch seinen erhöhten Wert; 3 Wochen nach der Entbindung kehrt er zum normalen Wert zurück.

3. Im Nabelschnurblut der Neugeborenen findet sich das Brom in konstanter Menge: der Bromspiegel steht viel niedriger als der der Kreissenden, aber viel höher als der des erwachsenen Menschen.

4. Bei Struma simplex steht der Bromspiegel niedriger, bei Morbus Basedowii dagegen höher als bei Gesunden.

5. Bei Diabetes mellitus ist er erhöht.

6. Beim Hunde steht er auf einer konstanten Höhe; er schwankt bei verschiedenen Hunden und in verschiedenen Zeiten bei demselben Tiere nur innerhalb enger Grenzen.

7. Die subkutane Injektion von Thyroxin und Adrenalin ruft eine Erhöhung des Bromspiegels hervor, während hingegen bei subkutaner Applikation von Insulin und Hypophysenhinterlappenhormon eine Herabdrückung des Bromspiegels gefunden wird.

8. Die Exstirpation von Ovarium oder Hoden ruft einen erhöhten Bromspiegel hervor, welcher dann etwa vom 10. Tage an auf einem konstanten Anfangswert bleibt.

9. Im Gegensatz dazu bringt die subkutane Applikation von Ovarialhormon eine Herabdrückung des Bromspiegels mit sich.

10. Das Hormon des Hypophysenvorderlappens ruft, wenn subkutan injiziert, eine auffallende Erhöhung des Bromspiegels hervor. Diese Erhöhung ist bei Hunden, denen man Ovarien oder Hoden exstirpiert hat, viel höher und langdauernder als bei intakten Tieren. Die beiden sexuell wirkenden Organe, Hypophysenvorderlappen einerseits, Ovarium oder Hoden andererseits, wirken auf den Bromspiegel in ganz entgegengesetzter Richtung ein. Die



Erhöhung des Bromspiegels in der Schwangerschaft wird also teilweise aus der Funktionssteigerung des Hypophysenvorderlappens zu erklären sein.

11. Pilocarpin wirkt herabdrückend, Atropin und Adrenalin dagegen erhöhend auf den Bromspiegel ein: die Vagusreizung wird wohl eine Herabdrückung, die Vaguslähmung und Sympathikusreizung eine Erhöhung des Bromspiegels hervorrufen.

12. Die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung allein ruft eine kurzdauernde Herabdrückung des Bromspiegels hervor. Es ist deswegen auf die eigentliche Wirkung einer bestimmten Substanz auf den Bromspiegel erst nach dem Fortfall dieser initialen Herabdrückung zu schliessen.

13. Durch das erwähnte Zusammenspiel zahlreicher entgegengesetzt wirkender innersekretorischer Sekrete bleibt wohl der Bromspiegel bei gesunden Individuen auf einer konstanten Höhe. Durch die gestörte Koordination zwischen diesen Organen tritt aber eine Erhöhung oder eine Herabdrückung des Bromspiegels zu Tage. *Der Hypophysenvorderlappen scheint aber in Bezug auf den Bromspiegel des Blutes im Zentrum zu stehen.*

Zum Schlusse habe ich die angenehme Pflicht zu erfüllen, Herrn Prof. Dr. S. Nakagawa für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

- Baldauf und Pincussen (1930): Kl. W. Nr. **39**, 1825.  
Bernhardt und Ucko (1926), Bioch. Zs., **170**, 459.  
Ewer (1932): Zs. kl. M., **122**, 244.  
Ishikawa (1927–28): Zs. d. med. Gesell. f. inn. Med. zu Tokyo, 15–16  
(Japanisch)  
Kuranami (1932): Diese Zs., **15**, 205.  
Roman (1929): Bioch. Zs., **207**, 416.  
Schneider (1931): Der Chirurg, **3**, 601.  
Toxopeus (1930): Arch. f. exp. Path. und Pharm., **154**, 247.  
Tanino (1931): Kl. W. Nr., **30**, 1406; Bioch. Zs., **241**, 392.  
Uhlmann (1931): Deut. Zeits. f. Nevenheilk., **122**, 36.  
Veil und Sturm (1925): D. A. kl. M., **147**, 166.  
Zondek und Bier (1932): Kl. W., **11**, 633, 759.



## INFLUENCE OF GLUTATHIONE AND MONOiodoacetic Acid ON THE PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM HEXosediphosphoric ACID BY ANIMAL TISSUES.

By

SAMURO YAMAZOYE.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College, Niigata,  
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, August 3, 1933)

A series of experiments has been made in our laboratory on the reactions which involve the formation of lactic acid from hexosediphosphoric acid by the action of animal tissues. It has been the hope that by simplifying and accommodating the circumstances a study of these reactions may throw some light on the true feature of the natural glycolysis. However, there are some evidences which indicate that this system of the lactic acid formation does not necessarily represent the lower half of the course of the natural glycolysis. Nevertheless the system must show a very close resemblance to it. It should be noted here that in the present work hexosediphosphoric acid was assumed in Neuberg's manner, for the time being, to produce lactic acid through the intermediary stages of hexosemonophosphoric acid, free hexose and methylglyoxal, and the enzyme system was presumably supposed to be phosphatase-glycolase-glyoxalase.

In the following are given the results of the experiments which dealt with the effect of glutathione and monoiodoacetic acid on our system of the lactic acid formation from hexosediphosphoric acid. Because of the attractive nature of the rôle of glutathione and iodoacetic acid in the lactic acid formation, new facts have been continuously reported while the present work has been under progress.

## Experimental.

### I. INFLUENCE OF GLUTATHIONE ON THE PRODUCTION OF LACTIC-ACID FROM HEXOSEDIPHOSPHORIC ACID.

*Enzyme solution:* The clear filtrate of the autolysate of the rabbit liver which was incubated with four times quantity of boric acid-borax buffer (pH 7.0) and toluene at 37°C. for 48 hours.

*Substrate:* Sodium hexosediphosphate prepared from calcium salt (Candiolin).

*Determination of phosphorus:* Kuttner and Lichtenstein's method (1930). *Methylglyoxal:* Our method or Barrenscheen and Dreguss' method (1931). *Lactic acid:* the Friedemann, Cotonio and Shaffer method. *Glutathione:* the Kühnau method (1931, i). The determination methods for hexosemonophosphoric acid and free hexose which are formed from diphosphoric acid, were not reliable. Monophosphoric acid was determined by Vøgt's method (1929) and the free hexose by Hanes' method with the application of fermentation to the hexose-phosphates-free solution.

#### a) Dephosphorylation.

The influence of glutathione on phosphatase was examined in the following experiments.

1). 5 cc. enzyme solution + 0.5 gm. Na-hexosediphosphate + 50 mg. glutathione + 100 cc. boric acid-borax buffer of pH 6.2 + 3 cc. toluene, diluted to 250 cc. with water, 37°C.

2). Same as (1), but without glutathione.

It was repeatedly observed that the presence of glutathione had no influence on the liberation of phosphorus from hexosediphosphate by the action of our enzyme system (Table I). Lohmann (1933, ii) made a similar observation in his recent experiments. Waldschmidt-Leitz's statement (1932, 1933) that glutathione inhibited the phosphatase action, conflicts, however, with these findings.

TABLE I.

Influence of Glutathione on Disintegration of Hexosediphosphoric Acid.

A = with glutathione

B = without glutathione

Time of incubation (hrs.)	Amount of products (mg. %)									
	Methylglyoxal		Lactic acid		Inorgan. P		Hexosemono-phosphoric acid		Free hexose	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24	0.07	5.56	10.08	0	5.19	5.34	2.68	3.10	4.1	4.3
48	0.19	5.36	21.84	0	8.97	9.00	3.62	3.10	1.3	1.5
72	0.44	4.62	24.96	0	10.83	10.86	—	—	—	—

*b). Production of methylglyoxal and conversion of methylglyoxal into lactic acid.*

The experimental conditions were the same as (a).

In addition to methylglyoxal, lactic acid and inorganic phosphorus were also determined at intervals. The estimation of lactic acid was made without removing the methylglyoxal produced and the hexosediphosphate remaining which gave rise to an increase in the lactic acid value. This was checked by the control experiments in which the influence of varying amounts of methylglyoxal and hexosediphosphate on the lactic acid determination was examined. The results are listed in Table I. The fact which stands out most clearly in the table is a marked formation of lactic acid with a slight accumulation of methylglyoxal in the presence of glutathione and the reverse phenomenon in its absence. This fact shows that glutathione acts as the co-enzyme of glyoxalase under the experimental conditions; in other words, methylglyoxal is converted into lactic acid by the activated glyoxalase of our enzyme system in the presence of glutathione.

Lohmann (1932) found that glutathione acted as the co-enzyme of glyoxalase only when the synthetic methylglyoxal was used as the substrate but that it had no effect in the natural glycolysis. In the light of his work the methylglyoxal formed from



hexosediphosphate by our enzyme system must be of the same chemical nature as the synthetic one and must differ from the compound which is supposed to be formed naturally from glycogen. Then it may be predicated that the decomposition of hexosediphosphoric acid into lactic acid by our enzyme system would take a different course from that of the natural glycolysis, or that different forms of methylglyoxal would be produced as the substrates vary in their chemical nature—stable hexosediphosphoric acid or hypothetical, labile hexosemonophosphoric acid. The solution of this problem must await further studies in this line.

Another point to be noted in Table I is that in the presence of glutathione a greater part of the dephosphorylated products of hexosediphosphoric acid is converted into methylglyoxal and lactic acid, while in its absence the conversion is very incomplete; or, expressed differently, the total amount of 3-carbon compounds was much less in the absence of glutathione than in its presence. The production of hexosemonophosphoric acid and free hexose was not so seriously affected by glutathione to account for this discrepancy. The following fact may be taken as one of the reasons for this phenomenon. It was observed on occasions that the methylglyoxal which had been once produced from hexosediphosphoric acid gradually disappeared by further incubation without changing to lactic acid. The synthetic methylglyoxal added was not consumed to a noticeable degree by incubation with the enzyme solution. The chemical nature which involves this disappearance of methylglyoxal is not clear at present. In the presence of glutathione the methylglyoxal formed might not have time to suffer the above-mentioned change, since it is converted to lactic acid the moment it is produced.

The continuous production of lactic acid from hexosediphosphoric acid even after a prolonged time of incubation in the presence of glutathione must necessarily be connected with the survival of glutathione and glyoxalase for a long incubation. As was observed by Hopkins and Elliot (1932) glutathione which is quite unstable in its neutral or even slightly acid solution acquired stability in the presence of tissue (enzym solution), and

a good quantity of it was found left under the experimental conditions after four days' incubation.

One third of the enzyme was still active after the lapse of 4 days (6 days after killing the animal).

The direct reaction between methylglyoxal and glutathione was reported by Kühnau (1931, ii), Lohmann (1932) and Jowett and Quastel (1933). However, the reaction was negligible under our experimental conditions. The incubation of the mixture which contained glutathione and methylglyoxal in 0.01 or 0.001 mol concentration, at 37° and at pH 6, 7 and 8 did consume both substances and this tendency was more marked with the increasing hydrogen-ion concentrations. However, the interaction took place only to so slight an extent that Jowett and Quastel's attractive hypothesis of the intermediary formation of glutathione-methylglyoxal compound on the way to lactic acid cannot be accepted, as it stands, in the absence of the enzyme action.

## II. INFLUENCE OF MONOiodoacetic ACID ON THE PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM HEXOSEDIPHOSPHORIC ACID.

### *a). Dephosphorylation and production of methylglyoxal.*

The experiments were made under the same conditions as in (a) of Part I. The exception was the use of 50 mg. of monoiodoacetic acid (neutralized) instead of glutathione. As is shown in Table II iodoacetic acid was completely ineffective, not only in the production of inorganic phosphorus but in the formation of hexosemonophosphoric acid, free hexose and methylglyoxal.

When fresh liver extract was used in place of the autolyzed one, methylglyoxal accumulated in a higher amount with the addition of the increasing amount of iodoacetic acid while the order was just the reverse in the case of the lactic acid production. This indicates clearly that the inhibiting action of iodoacetic acid was restricted to glyoxalase. The liberation of inorganic phosphorus was also almost unaffected but there was a very slight tendency toward the depression of phosphatase action after a long incubation (Table III).

TABLE II.

Influence of Monoiodoacetic Acid on Disintegration of Hexosediphosphoric Acid by Autolyzed Liver Extract.

A = with iodoacetic acid

B = without iodoacetic acid

Time of incubation (hrs.)	Amount of products (mg. %)									
	Methylglyoxal		Lactic acid		Inorgan. P		Hexosemono-phosphoric acid		Free hexose	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24	5.78	5.80	0	0	5.34	5.34	2.94	3.11	7.1	7.3
48	5.60	5.61	0	0	9.00	9.00	2.94	3.11	1.5	1.5
72	5.04	5.07	0	0	10.16	10.16	—	—	—	—

TABLE III.

Influence of Iodoacetic Acid on Disintegration of Hexosediphosphoric Acid by Fresh Liver Extract.

A = with 50 mg. of iodoacetic acid

B = with 20 mg. of acid

C = without acid

Time of incubation (hrs.)	Amount of products (mg. %)								
	Methylglyoxal			Lactic acid			Inorganic P		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
24	5.2	3.8	0.3	2.4	7.9	18.3	7.3	7.3	7.4
48	3.9	3.3	0.5	2.9	8.9	26.7	9.3	9.7	10.5

Lohmann (1931) had once assumed that monoiodoacetic acid would perhaps inhibit all the intermediately reactions of lactic acid formation, especially the synthesis and the decomposition of the hypothetical, labile hexosemonophosphoric acid, and that the slight inhibitory effect of iodoacetic acid upon glyoxalase activity would be based on its direct action on the enzyme but not on the co-enzyme. Very recently, he (1933, ii) stated, however, that iodoacetic acid had no noticeable effect on the action of phosphatase. That monoiodo- and monobromoacetic acid had no inhibitory action

on phosphatase was observed by Yamasaki (1930) and Haarmann (1932).

*b). Conversion of methylglyoxal into lactic acid.*

Iodoacetic acid had strong, antiglyoxalatic action and this was more marked, as Dudley (1931) pointed out, with prolonged contact of the acid with the enzyme. Barrenscheen's statement (1931, iii) that the previous treatment of tissue with iodoacetic acid was wholly ineffective on the disappearance of methylglyoxal is not correct. The inhibitory effect of iodoacetic acid was almost exclusively restricted to co-enzyme. The depression of the activity of the enzyme itself was quite slight as compared with that of the co-enzyme. These facts were observed in the following experiments.

The fresh glyoxalase solution (1:4 watery extract of rabbit liver) was divided into two portions; the one was dialyzed overnight at 10° against running water through collodion membrane; another was boiled for 15 minutes and the filtrate was stored overnight in an ice chest (co-enzyme). (A) Several 3 cc.-portions of the dialyzed, co-enzyme-free enzyme were added with 20 mg. of neutralized iodoacetic acid and 25 cc. of boric acid-borax buffer of pH 7, and incubated at 37°. After 0, 20, 60 and 120 minutes' incubation a portion was further added with 10 cc. of co-enzyme solution and 14.4 mg. of methylglyoxal, made up to 50 cc. with the buffer solution of pH 7, and methylglyoxal was examined in the trichloroacetic acid filtrate. (B) 10 cc.-portions of co-enzyme solution were treated with iodoacetic acid in just the same way as in (A). After 0, 20, 60, 120 minutes' incubation a portion was further added with 3 cc. of dialyzed, co-enzyme-free enzyme and 14.4 mg of methylglyoxal, and diluted to 50 cc. with the buffer solution of pH 7. After 30 minutes' incubation at 37°, the decrease of methylglyoxal was examined. Control experiments which were run in (A) and (B) without the addition of iodoacetic acid, showed that the incubation of the enzyme, or the co-enzyme alone did not weaken their activity. Similar experiments were made, using 10 cc. of glutathione solution (10 mg.) instead of

co-enzyme solution. It was shown in control experiments that the velocity of the spontaneous disappearance of glutathione was much accelerated in the presence of iodoacetic acid, and that the degree of this acceleration just corresponded to that of inhibition of the co-enzyme activity by the acid. The results are summarized in Table IV and V.

TABLE IV.  
Influence of Iodoacetic Acid on Glyoxalase and Co-enzyme.

A = enzyme was incubated with iodoacetic acid

B = co-enzyme was incubated with iodoacetic acid

Decrease of methylglyoxal was examined after 30 minutes' standing at 37°C.

	Time of incubation with iodoacetic acid			
	0 min.	20 min.	60 min.	120 min.
	Decrease of methylglyoxal			
	%	%	%	%
A	62.6	57.7	56.4	56.0
B	76.0	41.3	24.4	15.8

TABLE V.  
Influence of Iodoacetic Acid on Glutathione as Co-enzyme of Glyoxalase.

A = enzyme was incubated with acid

B = glutathione was incubated with acid

Decrease of methylglyoxal was examined after 20 minutes' standing.

	Time of incubation with acid			
	0 min.	20 min.	60 min.	120 min.
	Decrease of methylglyoxal			
	%	%	%	%
A	100	87.5	86.5	83.0
B	60.8	40.8	13.5	1.4

As to the action of iodoacetic acid on glyoxalase, Dudley (1931) and Lohmann (1931) stated that iodoacetic acid inhibited



the glyoxalase action, while Barrenschæen (1931, iii) and Haarmann (1932) were against this view. Dickens (1933) stated in his short note published recently that the arresting effect of iodoacetic acid on glyoxalase activity was completely reversed by the addition of reduced glutathione at the same molecular concentration as the acid, and that these substances reacted vigorously one with another. He concluded from this observation that the action of iodoacetate did not involve the irreversible destruction of the enzyme itself. According to the latest statement of Lohmann (1933, i) iodoacetic acid impeded the glyoxalase action by consuming the co-enzyme, the reduced glutathione.

Now that it was established that iodoacetic acid reacted almost exclusively with co-enzyme but not with the enzyme, experiments were carried out on the interaction between the acid and glutathione in a mixture of their pure solutions at various hydrogen-ion concentrations. 20 mg. of glutathione dissolved in 20 cc. of the buffer solution of pH 7 and 10 mg. of neutralized iodoacetic acid dissolved in 5 cc. of water, were incubated at room temperature with 25 cc. of buffer solutions of pH 5, 7 and 8.5 respectively. The decrease of glutathione was examined at intervals. As listed in Table VI, the direct reaction of both substances took place more markedly with increasing pH values. That glutathione reacted

TABLE VI.  
Interaction between Glutathione and Iodoacetic Acid.

A = with iodoacetic acid

B = without iodoacetic acid

Time of incubation (min.)	Decrease of glutathione (mg. %)					
	pH 5.0		pH 7.0		pH 8.4	
	A	B	A	B	A	B
0	0	0	0	0	0	0
30	2.2	0	8.9	4.9	30.0	14.1
60	3.2	0	15.1	7.2	36.4	16.8
90	3.4	0	18.6	10.3	39.1	20.6
120	4.2	0.2	23.0	12.4	39.4	28.5

directly with iodoacetic acid was demonstrated recently by Dickens (1933) and Quastel (1933).

The glyoxalase poisoned with iodoacetic acid still showed almost quantitative conversion of methylglyoxal into lactic acid.

10 cc. of the fresh extract of rabbit liver and 10 mg. of iodoacetic acid (neutralized) were diluted to 25 cc. with the buffer solution of pH 7 and left at room temperature. At intervals (20 or 40 minutes), 5 cc. of this mixture were pipetted out, added with 7.2 mg. of methylglyoxal and made up to 25 cc. with the buffer solution of pH 7. After 20 minutes' incubation at 37° the decrease of methylglyoxal and the increase of lactic acid were examined in the trichloroacetic acid filtrate. It was shown in control experiments that 20 minutes' incubation was long enough to consume all the methylglyoxal in the absence of iodoacetic acid. It may be noticed in Table VII that there is a slight tendency of inhibition of the rate of the conversion, methylglyoxal  $\rightarrow$  lactic acid, in the presence of iodoacetic acid, as the rate is always over 95% in the absence of acid. Nevertheless, the depression is far less as compared with Barrenschéen's experiments where the production of lactic acid was below 50% of the calculated value.

TABLE VII.  
Conversion of Methylglyoxal into Lactic Acid by Glyoxalase in  
Presence of Iodoacetic Acid.  
Time of incubation = 20 min.

Number of experiment	Decrease of methylglyoxal (mg. %)	Increase of lactic acid (mg. %)	Conversion (%)
I	10.92	11.27	83.1
II	16.44	17.50	85.1
III	12.35	14.21	92.0

The *in vivo* poisoning of iodoacetic acid also depressed the glyoxalase activity but the rate of the conversion, methylglyoxal  $\rightarrow$  lactic acid, was left almost unaffected. 120 mg. of iodoacetic acid (neutralized) per kilo body weight were injected subcutaneously in the rabbit. After the development of severe symptoms of

poisoning, liver was excised out and extract was freshly made. 4 cc. of this extract and 2.88 mg. of methylglyoxal were diluted up to 50 cc. and kept at 37°. The decrease of methylglyoxal and the increase of lactic acid were determined at intervals. The data are listed in Table VIII.

TABLE VIII.  
Conversion of Methylglyoxal into Lactic Acid by Glyoxalase Prepared  
from Liver of Rabbit Poisoned with Iodoacetic Acid.

Time of incubation (min.)	Decrease of methylglyoxal (mg. %)	Increase of lactic acid (mg. %)	Conversion (%)
5	±0	±0	
10	4.40	4.86	87.1
20	10.48	9.9	75.5
30	15.16	16.2	85.5

Thus Barrenscheen's description (1931, iii) that iodoacetic acid did not inhibit the disappearance of methylglyoxal by glyoxalase but did strongly inhibit the formation of lactic acid from methylglyoxal was disproved. The same author made contradictory remarks in other reports (1931, i and ii) that the fresh tissues and yeast produced methylglyoxal from hexosediphosphate after a few hours' incubation in the presence of iodoacetic acid. This phenomenon cannot be explained unless iodoacetic acid does inhibit the action of glyoxalase of destroying methylglyoxal.

#### SUMMARY.

1. In the course of the disintegration of hexosediphosphoric acid to lactic acid by a series of enzyme systems which are contained in autolyzed liver, the accelerating effect of reduced glutathione operated only on glyoxalase. Other enzyme were unaffected.
2. The inhibitory action of moniodoacetic acid was also restricted to glyoxalase only. The acid reacted with the co-enzyme, reduced glutathione, but not with glyoxalase itself.

## REFERENCES.

- Barrenscheen, H. K. and Braun, K. (1931, i): *Biochem. Z.*, **231**, 144.  
Barrenscheen, H. K., Braun, K. and Dreguss, M. (1931, ii): *Biochem. Z.*, **232**, 165.  
Barrenscheen, H. K., Braun, K. and Dreguss, M. (1931, iii): *Biochem. Z.*, **240**, 381.  
Barrenscheen, H. K. and Dreguss, M. (1931): *Biochem. Z.*, **233**, 305.  
Dickens, F. (1933): *Nature (London)*, **131**, 130.  
Dudley, H. W. (1931): *Biochem. J.*, **25**, 439.  
Haarmann, W. (1932): *Biochem. Z.*, **256**, 326.  
Hopkins, F. G. and Elliot, K. A. C. (1932): *Proc. Roy. Soc., B.*, **109**, 58.  
Jowett, M. and Quastel, J. H. (1933): *Biochem. J.*, **27**, 486.  
Kühnau, J. (1931, i): *Biochem. Z.*, **230**, 353.  
Kühnau, J. (1931, ii): *Biochem. Z.*, **243**, 14.  
Kuttner, T. and Lichtenstein, L. (1930): *J. Biol. Chem.*, **86**, 671.  
Lohmann, K. (1931): *Biochem. Z.*, **236**, 444.  
Lohmann, K. (1932): *Biochem. Z.*, **254**, 332.  
Lohmann, K. (1933, i): *Biochem. Z.*, **262**, 152.  
Lohmann, K. (1933, ii): *Biochem. Z.*, **262**, 157.  
Quastel, J. H. (1933): *Nature (London)*, **131**, 206.  
Vogt, M. (1929): *Biochem. Z.*, **211**, 17.  
Waldschmidt-Leitz, E. and Schöffner, A. (1932): *Naturw.*, **20**, 122.  
Waldschmidt-Leitz, E., Scharikova, A. and Schöffner, A. (1933): *Z. physiol. Chem.*, **214**, 75.  
Yamasaki, I. (1930): *Biochem. Z.*, **228**, 123.

## ON THE TOXICITY OF URINE AND SERUM PROTEIC ACID FRACTION.

By

YOSHIO GAMO.

*(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University,  
Director: Prof. S. Kakiuchi)*

(Received for publication, August 6, 1933)

### I. INTRODUCTION.

As we all know there are many suggestions about the cause of the uremia produced when the excretion of kidney is heavily damaged. But we do not know what is the true cause. In the following I have tried to show that the part of non-protein nitrogen which is called oxypoteic acid might be an essential factor in the development of uremia. The so-called oxypoteic acid can not be identified as a definite compound and is said to be a mixture of urea with other non-nitrogenous matter. Although we can almost free it from urea, we do not know yet whether it is not a compound of urea. It is shown however, in my experiments, that the oxypoteic fraction of urine is strongly poisonous and causes uremic symptoms and also that, in normal condition, it is excreted through the kidney to maintain its amount in blood under the toxic dosis. In the uremic conditions the blood contains it in a toxic dosis. It becomes then quite likely that if the excretion of oxypoteic acid in urine is so damaged that its amount in blood reaches the toxic dosis, uremic symptoms unavoidably develop.

### II. METHOD.

To judge the toxicity of any substance within the body it is quite important to know whether or not that substance is maintained for a long time in the blood or is excreted very soon. As many substances are excreted through the kidney and the velocity of the excretion may differ by various conditions, I adopted the



method of comparing the toxicity of urine constituent by injecting the substance into the nephrectomized animal; within its body there occurs no excretion outside. The use of this method must be carefully conducted, as too much prolongation in the experiment may be blurred by the deleterious effect of nephrectomy alone. I have, therefore, followed the change in blood constituents after the nephrectomy and determined the time in which this method of test could be used.

Without using any kind of anaesthetics both the kidneys of the rabbit were extirpated retroperitoneally. Male rabbits, weighing about 2 kilos were used. After the operation except for a few which showed a normal appetite, the animal ordinarily took no food. The loss of vigor developed soon, diarrhea set in and within 3 or 4 days all the animals died. No symptom of eclampsia appeared.

### III. THE CHANGE IN BLOOD AFTER THE BILATERAL NEPHRECTOMY.

#### 1. *The change in erythrocyte, leucocyte and hemoglobin content.*

The number of erythrocyte and leucocyte were determined by the Thoma-Zeiss method, and the content of hemoglobin by the Sahli method. The results are summarized in table I and figure 1.

We can see from the table and figure that the erythrocyte number and the hemoglobin content diminish after the nephrectomy; this is certainly related to the increase of plasma volume. The leucocytose develops after the kidney extirpation.

#### 2. *The change in the pH value and the carbon dioxide capacity.*

The pH value of blood was determined colorimetrically with phenol red and the carbon dioxide capacity gasometrically by the Van Slyke method. The results are shown in table II and figure 2.

The table and figure show that the acidity of blood increases and that its alkali reserve decreases after the bilateral nephrectomy.

TABLE I.

The number of erythrocytes and leucocytes, and the hemoglobin content.

	No. of rabbit	Before the extirpation	After the extirpation		
			24h	48h	72h
Number of Erythrocytes	1	7,780,000	5,810,000	4,780,000	
	3	7,850,000	6,240,000	3,900,000	
	15	5,880,000	5,010,000	3,520,000	
	17	9,290,000	7,470,000	5,420,000	4,210,000
	18	7,220,000	6,620,000	4,080,000	3,580,000
Number of leucocytes	1	7,500	8,200	11,900	
	3	7,700	10,900	14,200	
	15	7,600	11,200	12,800	
	17	7,400	10,800	12,800	12,800
	18	8,300	11,000	13,100	13,700
Hemoglobin content (Shali)	1	81	72	64	
	3	72	53	46	
	15	77	62	43	
	17	83	69	51	42
	18	87	71	61	48

Fig. 1(a).

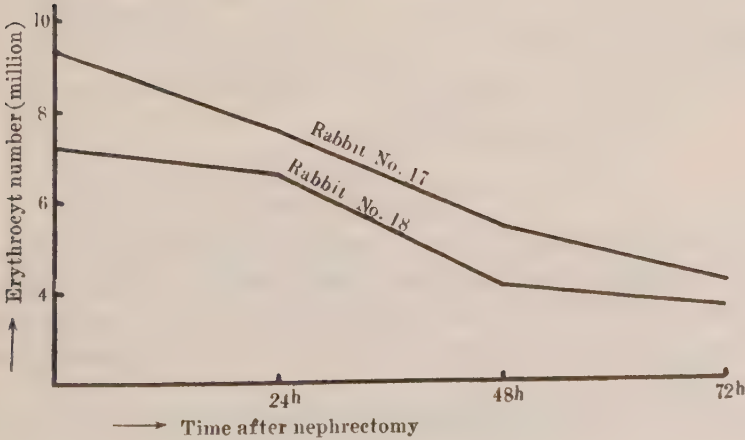


Fig. 1(b).

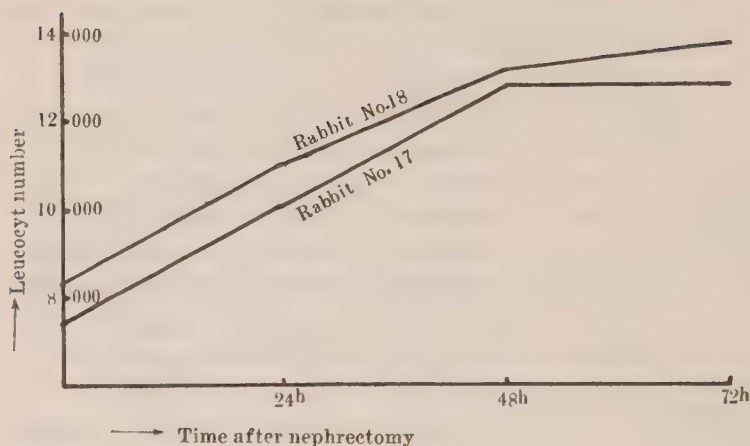
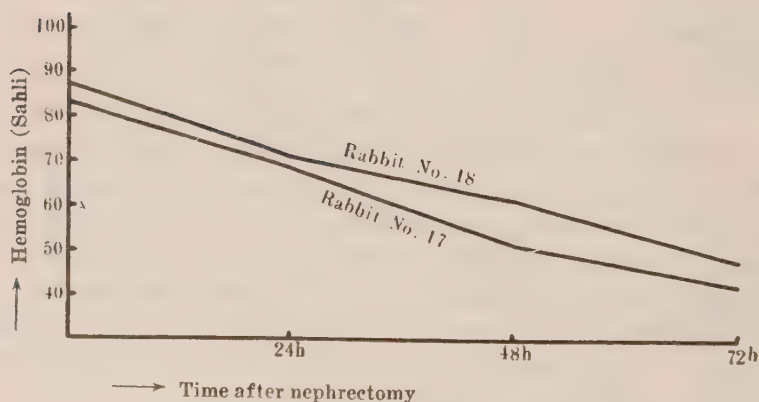


Fig. 3(c).



### 3. The blood volume.

The determination of blood volume was made by the Saso method (1930), using Vital red. The principle of this method consists in a definite amount of the dye stuff being injected into the vein and its concentration in blood is to be determined after 4 minutes.

In this method the assumptions are made that the dye is dis-

TABLE 11.  
The pH value and the CO<sub>2</sub> content.

	Rabbit No.	Before extirpation	After extirpation		
			24h	48h	72h
pH	8	7.30	—	7.12	—
	9	7.40	7.31	—	—
	15	7.51	—	7.29	—
	17	7.41	—	7.20	7.20
	18	7.40	7.30	—	7.11
CO <sub>2</sub> Capacity %	3	47.3	—	44.4	—
	8	45.1	—	41.7	—
	14	45.3	42.2	—	—
	15	42.8	—	40.7	—
	17	41.3	—	—	32.1
	18	38.0	—	—	30.9

Fig. 2(a).

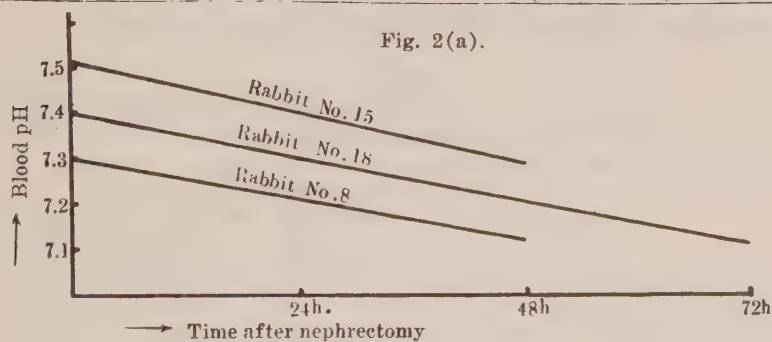
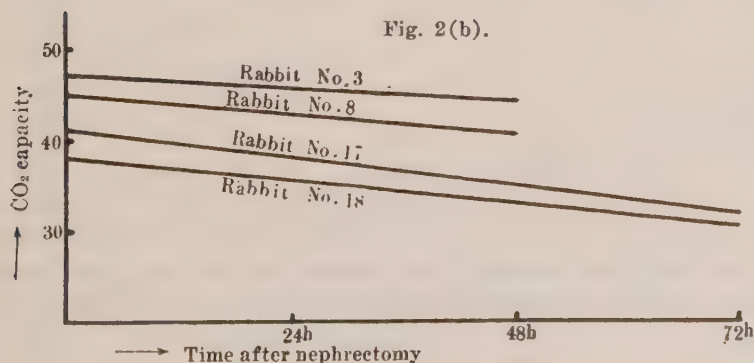


Fig. 2(b).



tributed within blood thoroughly and no leakage occurs during the time. Therefore if the permeability of blood vessel increases abnormally, and the dye diffuses out of the vessel, the blood volume of that animal appears to have a larger volume than the normal animal. The increase of the permeability of blood corpuscles calls forth also the same result.

Accordingly for the colorimetric determination of blood volume after the nephrectomy, this change of blood vessel and corpuscles membrane must be taken into consideration, and the correction must be made.

For this correction the reading of colorimetric value was made twice, 4 and 10 minutes after the injection of the dye, and from the value at 4 and 10 minutes the value at zero minute was determined by the extrapolation method. The zero time value was assumed as the true value and the correction in reading at 4 minutes was calculated. The corrections to be made 48 and 72 hours after the bilateral nephrectomy are shown in table III.

TABLE III.  
The correction value for the colorimetric reading in  
nephrectomized animals.

		Rabbit No.	Plasma volume after the dye injection			Correction value
			4'	10'	0'	
Before extirpation		26	48	48	48.0	0
		27	50	50	50.0	0
After extirpation	48 <sup>h</sup>	24	54	61	49.3	-4.7
		25	62	68	58.1	-3.9
		26	65	72	61.0	-4.0
	72 <sup>h</sup>	25	70	77	65.3	-4.7
		29	72	79	67.4	-4.6
		30	73	79	69.0	-4.0

In the Saso method, 1 cc. belongs to the range of error. I have therefore made the correction in all my experiments as follows.



In normal animal: No correction.

48 hours after the nephrectomy: reduce 4 cc.

72 hours after the nephrectomy: reduce 5 cc.

By the above method the plasma and blood volume were determined before, 48 hours and 72 hours after the nephrectomy. The results are shown in table IV and fig. 3.

TABLE IV.  
The change of blood volume after the nephrectomy.

	Rabbit No.	Before extirpation	After extirpation	
			48h	72h
Percentage of plasma	22	67	71	83
	23	68	74	
	24	68	72	
	25	68	75	84
	26	65	70	
Volume of plasma per kilo body weight	22	40	56	66
	24	44	49	
	25	42	57	65
	26	48	61	
Blood volume per kilo body weight	22	59	79	80
	24	65	68	
	25	62	76	77
	26	74	86	

Fig. 3(a).

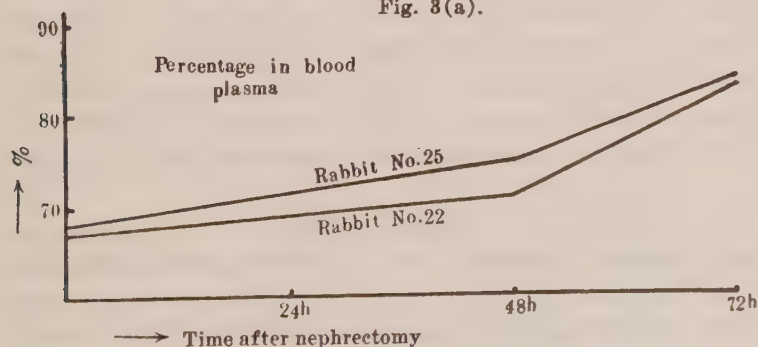
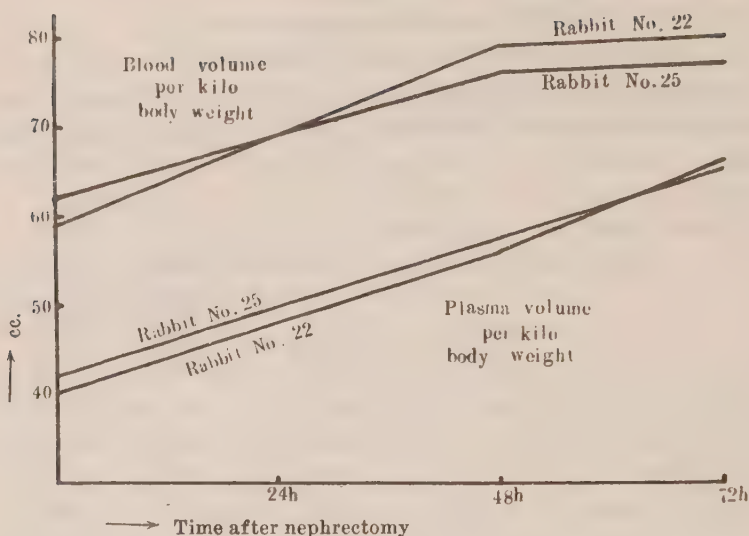


Fig. 3(b).



As the table and figure show, both the total blood and plasma volume increase steadily after the nephrectomy. This is accompanied by a decrease in erythrocyte number and by that of hemoglobin content.

#### 4. *The change in the blood residual nitrogen.*

The change of the amount in the blood residual nitrogen after the nephrectomy is the most interesting one.

By the blockage of kidney excretion an increase in the amount of nitrogenous metabolic product in blood must result, although a small part is defrayed by the compensatorily augmented excretion through skin, digestion tube and lung and another portion by depositing to various organs and tissues. How rapidly these products increase in blood and when impediment results are what interest us here.

*Method.* 40-60 cc. of blood are obtained by cutting the Arteria jugularis of rabbit at the normal, 24, 48 and 72 hours after the bilateral nephrectomy.

The total nitrogen is determined by the Kjeldahl method

direct with a definite amount of blood, the total residual nitrogen with the deproteinized phosphotungstic acid filtrate, polypeptid-nitrogen through the difference of nitrogen content between the trichloroacetic acid filtrate and the phosphotungstic acid filtrate. Urea is estimated by the Van Slyke and Cullen method, and amino acid by the Van Slyke gasometric method. For the determination of creatine and creatinine the blood is obtained by heart puncture and the Folin-Wu method is followed.

The result is shown in table V, VI figure 4 and 5.

TABLE V.

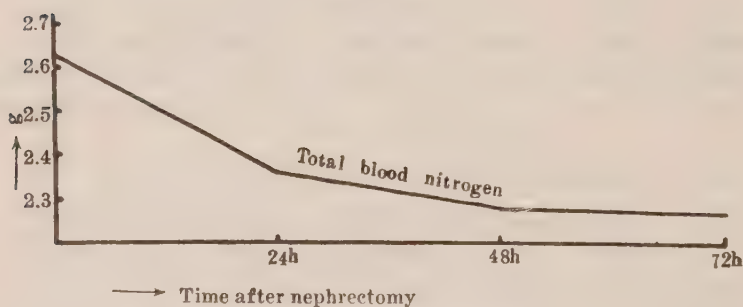
The change in the content of residual nitrogen of blood after bilateral nephrectomy (mg%).

Rabbit No.	Total nitrogen	Total residual N	Polypeptid N	Urea N	Amino N	Non urea amino N
Normal						
10	2500	41.0	4.2	15.5	14.5	11.0
11	2750	47.0	4.4	23.7	11.8	11.5
12	2650	32.6	5.8	13.0	11.6	8.0
Average	2630	40.2	4.8	17.4	12.6	10.2
24 hours after nephrectomy						
6	2470	110.9	14.1	63.7	25.0	22.2
9	2330	92.7	10.7	45.6	24.3	22.8
14	2310	112.0	12.6	70.0	23.0	19.0
Average	2360	105.2	12.5	59.8	24.1	21.3
48 hours after nephrectomy						
15	2450	181.8	15.4	141.9	16.3	23.6
16	2300	172.5	15.9	139.2	11.5	20.8
19	2080	168.1	15.5	132.2	20.3	15.6
Average	2280	174.1	15.6	137.8	16.0	20.3
72 hours after nephrectomy						
17	2350	182.8	21.4	137.5	21.5	23.8
18	2190	247.8	18.2	210.9	23.7	13.2
Average	2270	215.3	19.8	174.2	22.6	18.5

TABLE VI.  
The change in the content of creatine and creatinine after  
nephrectomy (mg%).

	Rabbit No.	Before nephrectomy	After nephrectomy	
			48h	72h
Residual N	28	48.1	200.2	248.1
	39	45.2	210.1	259.8
	Average	46.7	205.2	254.0
Creatine	28	2.72	9.5	11.1
	39	4.04	10.4	12.5
	Average	3.38	10.0	11.8
Creatinine	28	0.93	6.6	7.3
	39	1.34	7.1	10.1
	Average	1.14	6.9	8.7

Fig. 4(a).



From the tables and figures we can observe the following changes:

1. Total blood nitrogen decreases steadily with time after the nephrectomy. This is due mainly to the dilution of blood and the amount of the change is rather small as compared with the change of blood volume.

2. The amounts of total residual N, urea N, creatine N and creatinine N all increase steadily with time after nephrectomy by the cessation of its excretion through the kidney.

Fig. 4(b).

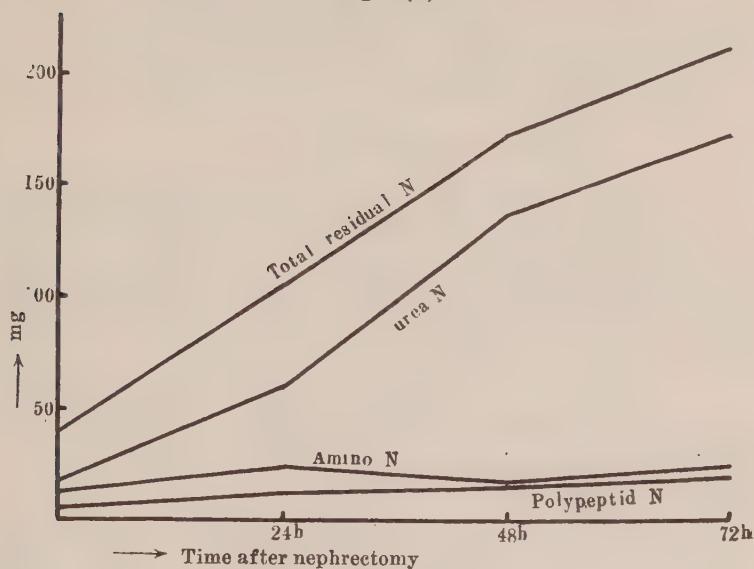
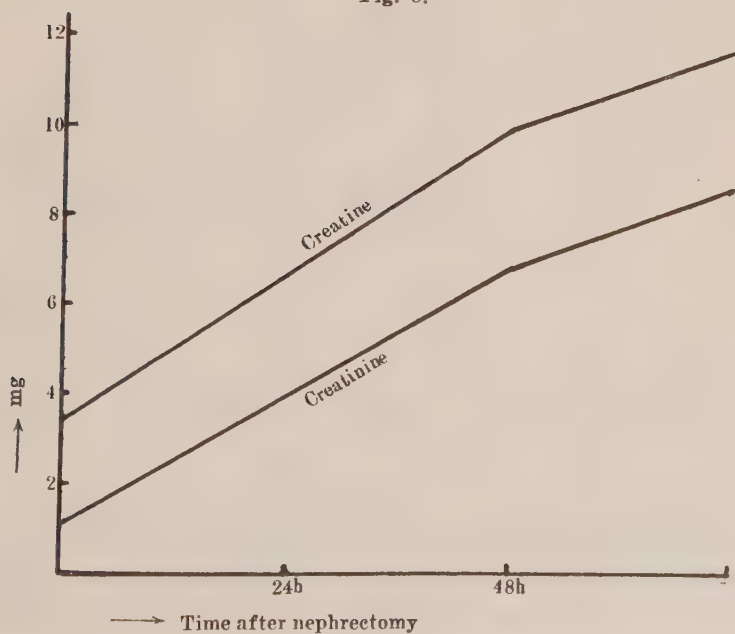


Fig. 5.





3. Amino-N and polypeptid nitrogen increase also after the nephrectomy. However, it is interesting to notice that the increase after 24 hours is rather small. This is perhaps due mainly to their intermediary position in metabolism.

### 5. Discussion

As far as I know, no one has studied thoroughly the change in blood constituents after the nephrectomy of rabbit. It seems to me interesting to compare the results of my experiment with those obtained in other animals by previous authors. The comparison is made in table VII and VIII.

TABLE VII.  
Length of life and conditions of animal after nephrectomy.

Kinds of animal	Length of life	Condition of animal after nephrectomy	Author
Dog	4-6 days	Apparently normal direct until death comes in. No nephritic symptom	Andrews (1927)
Dog	2-3 days	Quite active and good appetite. No symptom of acidosis	Swingle (1928)
White rat	2-3 days	Coma set in sometimes 48 hours after the operation	Chanutin and Silvette (1929)
Dog	60-140 hours	Normal till to 48-60 hours after the operation: Appetite is then lost with time and becomes powerless	Lyon, Shafton and Ivy (1929)
Dog	2-5 days	No acidosis observed	Ptaszek (1927)
Goat	14 days	Symptom like human anuria appeared	Allen, Scharf and Lundin (1925)
Rabbit	3-4 days	Appetite is lost and the animal becomes inactive. Diarrhea. No eclampsia.	Gamo

From these tables we can see that there is not much difference in the change of blood among animals and also, that the nephrectomized animal can withstand a great increase of many of the constituents of blood, which are excreted into urine in normal

TABLE VIII.  
The changes in blood of nephrectomized animals.

	Kind of animal	Before or after the operation	Experimental value				Author
Blood pH	Dog	Before	7.39	7.41	7.40	7.37	Swingle (1928)
		After	7.32	7.33	7.36	7.33	
	Rabbit	Before	7.30	7.51	7.41	7.40	Gamo
		After	7.12	7.29	7.20	7.11	
Blood carbon dioxide capacity	Dog	Before	50.6	45.5	44.8	48.1	Swingle (1928)
		After	47.7	39.4	43.7	40.3	
	Rabbit	Before	41.3	38.0	47.3		Gamo
		After	32.1	30.9	44.4		
Blood volume (pro kilo body weight)	Rabbit	Before	59	62			Gamo
		After	80	77			
Blood residual Nitrogen (mg%)	Dog	Before	36	24	23		Karsner, Bunker and Grabfield (1915)
		After	285	282	227		
	White rat	Before	43				Chanutin and Silvette (1929)
		After	239				
	Dog	Before	29.1	25.2			Lyon, Shafton and Ivy (1929)
		After	403.2	261.3			
	Rabbit	Before	32.6—47.0				Gamo
		After	182.8—247.8				
Blood urea Nitrogen (mg%)	Dog	Before	16	16	12	17	Swingle (1928)
		After	84	90	83	100	
	Dog	Before	21.6	14.0			Lyon, Shafton and Ivy (1929)
		After	257.2	143.6			
	Rabbit	Before	13.0—23.7				Gamo
		After	137.5—210.9				
Blood Amino Nitrogen (mg%)	Rabbit	Before	11.6—14.5				Gamo
		After	21.5—23.7				
Blood Creatinine (mg%)	Dog	Before	1.1	1.5			Lyon, Shafton and Ivy (1929)
		After	14.7	15.8			
	White rat	Before	1.5				Chanutin and Silvette (1929)
		After	9.6				
	Rabbit	Before	0.93	1.34			Gamo
		After	7.3	10.1			
Blood Creatine (mg%)	White rat	Before	4.3				Chanutin and Silvette (1929)
		After	14.4				
	Rabbit	Before	2.72	4.04			Gamo
		After	11.1	12.5			

animals. What is then the cause of death which sets in after a few days? I have tried, therefore, to test the toxicity of each of the urine constituents and to judge whether or not that constituent may contribute as a factor of death in the amount shown in blood at the time of death.

#### IV. THE TOXICITY OF URINE CONSTITUENTS.

##### 1. *Method of attack on the problem.*

The toxicity of urine constituents was tested with a nephrectomized animal. At first the toxicity of urea, creatine and creatinine was tested with negative result. Then the urine was separated into several fractions as water insoluble, water-soluble-alcohol-soluble and water-soluble-alcohol-insoluble barium salts, and each fraction was tested in regards its toxicity.

The urine was treated with baryta to remove sulphate, phosphate and other acids, which form insoluble barium salt. The excess of baryta in the filtrate was precipitated by a current of carbon dioxide and its filtrate was concentrated by evaporation on water bath to about one twentieth of the original volume, avoiding too much alkalization by bubbling a current of carbon dioxide at times. After filtering off the precipitated sodium chloride and basium carbonate, about eight times its volume of alcohol were added to the filtrate. The alcohol insoluble barium salt was precipitated out and separated by filtration from the alcohol soluble barium salt. Both the filtrate and the precipitate were freed from barium by the addition of the necessary amount of sulphuric acid and neutralized with natrium hydroxide. In the impure product the alcohol insoluble barium salt fraction contains yet a small amount of urea, ammonia and creatinine. By repeated reprecipitation it can be freed from these substances. For the sake of simplicity, the terms as urine extract A and B are used to designate the portion of residual nitrogenous substances in urine, the barium salt of which is soluble and insoluble in alcohol respectively.

2. *The toxicity of urea, creatine and creatinine.*

Into the aural vein of a nephrectomized rabbit, weighing 2.5 kilo, was injected the following mixture:

Urea	1.600 mg
Creatine	120 „
Creatinine	130 „
Water	7 cc.

This would increase urea to 1000 mg%, creatine to 80 mg% and creatinine to 80 mg%, which correspond to many times the value in the premortal blood of nephrectomized rabbit. The animal remained, however, entirely quiet. This suggests to us that the animal can withstand a great amount of urea, creatine and creatinine.

3. *The toxicity of water soluble barium fractions.*

Urine extract A and B in impure product showed the following analytic results.

TABLE IX.

		Total N	Urea N	Ammonia N	Creatinine N	Other N
Urine extract A	I	18,200	14,328	148	900	2,824
	II	26,400	19,263	217	1,173	5,737
	III	10,255	8,738	80	771	666
Urine extract B	II	678	358	15	26	279
	III	188	48	4	4	132
	IV	722	160	11	13	538
	V	811	355	18	30	408

The experiments performed with these fractions on nephrectomized rabbits gave results as are shown in table X.

From the table we can deduce the following facts.

1. Alcohol insoluble fraction is lethal with its quite small nitrogen amount, whereas alcohol soluble portion is not so toxic and urea, ammonia and creatinine can be tolerable at least when

TABLE X.

Minimal lethal dosis of fractions, the barium salts of which are either soluble or insoluble in alcohol.

		Minimal lethal dosis cc/per Kilo	The amount of a few substances contained in minimal lethal dosis				
			Total N	Urea N	Ammonia N	Creatinine N	Other N
Urine extract A	I	9	1638	1284	19	81	254
	III	23	2359	2010	18	177	154
Urine extract B	III	1.7	3.2	0.8	0.1	0.1	2.2
	IV	0.5	3.6	0.8	0.06	0.07	2.7
	V	0.8	6.5	2.9	0.2	0.2	3.4

their nitrogen amount do not exceed 2010, 19, and 177 mg respectively.

This suggests to us the way to search the nature of a substance which causes uremic symptoms. I have therefore decided to test the following points.

1. The toxic substance ought to contain nitrogen less than 2.2 mg per Kilo body weight as lethal dosis. This does not hinder the substance being entirely nitrogen free.

2. By what treatment does the toxic substance become inactive?

3. What is the physical nature of the substance?

1. *The influence of some chemical treatment on the toxicity of the substance, which forms an alcohol insoluble barium salt.*

a) *Treatment with KI<sub>3</sub>.*

It has been believed by some that the urinous poison is an alkaloid. As alkaloid and cholin can be removed by potassium iodine iodide I tried to learn the change in the lethal dosis of urine toxic substance after treatment with this reagent.

*Method:* The toxic substance (Extract B) was treated in centrifuge tube with 3/10 its volume of potassium trijodid solution (containing 15.7 gm jodine, 20.0 potassium jodide, 100 cc.



water) and centrifuged for 20 minutes at 3,000 rotation. The supernatant solution was freed from iodine by ether and from potassium iodide by silver oxide. The resultant solution was analyzed and injected for the determination of toxicity.

The lethal dosis of the substance before and after the iodine treatment contained the following amount of non urea-ammonia-creatinine fraction nitrogen per kilo body weight.

Extract B No.	Before	After
	the treatment	
III	2.2	2.4
IV	24.0	27.0
VII	0.7	0.5

We can see from this result, that the toxicity of this fraction does not change with the treatment of potassium iodide, indicating that the substance does not belong to alkaloid-like substances.

#### b) *Hydrolysis.*

5.0 cc. of extract B were hydrolysed by heating at 140°C under 4 atmospheric pressures in autoclave for 40 minutes either in neutral, acid or alkaline reaction. The toxicity of the substance thus treated was compared with the untreated sample. The result is shown in table XI in term of toxicity of untreated sample as 100.

TABLE XI.  
Toxicity of hydrolysed substance.

Extract B No.	Original substance	Hydrolysis by				
		Neutral reaction	Acidic		Alkaline	
			1 drop 1.0 N HCl	5 drops 1.0 N HCl	5 drops 10% NaOH	8 drops 10% NaOH
III	100%	63%				
VI	100%	68%	60%	36%	60%	59%

The table shows that the toxicity of the extract B is decreased by hydrolysis. The effect is especially manifest in hydrolysis by acid.

*c) Is the toxic substance dialysible?*

*Experiment 1.* 5 cc. of extract B VII<sub>2</sub>, the lethal dosis of which being 6.0 cc., was put into the collodium sack and placed in 10 cc. of distilled water for 4 hours. The outer solution showed the minimal lethal dosis of 18 cc.

*Experiment 2.* 5 cc. of the same extract B VII<sub>2</sub> was dialysed against 20 cc. of distilled water for 6 hours. The outer solution showed the minimal lethal dosis of 28 cc.

These experiments suggest to us that the toxic substance is dialysible through collodium membrane and its molecular weight is rather small.

*5. The toxicity of the oxyproteic acid fraction.*

Although the above described toxic extract B belongs to the so called oxyproteic fraction it contains nitrogenous substances, which belong to extract A, as urea, creatinine, ammonia, etc. and it may contain a substance, other than oxyproteic fraction, as impurity. It has been tried therefore to purify the barium salt of this fraction by repeated precipitation, freed at least from urea, creatinine and ammonia. The purified barium salt was decomposed with sulphuric acid and oxyproteic acid fraction was obtained as watery solution.

The minimal lethal dosis per kilo body of this purified substance contains 0.45–0.50 mg N.

*6. The toxicity of oxyproteic acid fraction (in narrow sense) and alloxyproteic acid fraction.*

The purified oxyproteic acid fraction described in the foregoing section was treated with lead acetate and filtered off the precipitate from the filtrate. Both the precipitate and the filtrate were decomposed by H<sub>2</sub>S separately, added with baryta, and the excess of baryta precipitated with the current of carbon dioxide. The

filtrate of barium carbonate was concentrated on the water bath, added with about 8 volumes its weight of absolute alcohol. The barium salt was decomposed by sulphuric acid. The lead precipitate gives alloxypoteic acid, while the filtrate gives oxypoteic acid.

The toxicity test showed that the minimal lethal dosis contained

0.27–0.30 mgN in oxypoteic acid fraction

3.28–3.30 „ in alloxypoteic acid fraction

The results obtained in this section and in foregoing sections clearly indicate to us that the oxypoteic acid in a narrower sense represents the toxic substance in urine.

#### V. THE TOXICITY OF OXYPROTEIC ACID FRACTION OF SERUM.

It was first shown by Browinski (1908) that the oxypoteic acid is present also in normal blood and its amount was determined by Deutchberger (1928), Roche (1920) and Imhäuser (1932).

As I have shown above that the oxypoteic acid fraction in urine is the toxic substance which causes uremic symptoms, I tried to verify first, that the oxypoteic acid fraction of serum has the same toxicity as that of urine, and then to determine what is the maximum amount permissible in serum without causing any trouble.

##### 1. *The toxicity of the alcoholic blood extract of the nephrectomized rabbit.*

After the lapse of 72 hours following the bilateral nephrectomy the blood was drawn out of the arteria jugularis of rabbits and hemolysed by the addition of a small amount of water.

After regulating the acidity of blood to pH 5, five times its volume of absolute alcohol were added to precipitate proteins. The filtrate was evaporated on the water bath to remove alcohol.

The solution obtained contained 1,353 mg% of total nitrogen, 1,129 mg% of urea nitrogen and 224 mg% of non urea nitrogen. The minimal lethal dosis of this solution was 8 cc., corresponding to 18 mg of non urea nitrogen.

## 2. *Toxicity of the oxyproteic acid fraction of normal horse serum.*

Fresh normal horse blood was immediately defibrinized by stirring with a pure glass rod. After staying in an ice chest for half a day the separated serum was deproteinized with the addition of 10% phosphotungstic acid. The filtrate was freed from phosphotungstic acid by adding saturated baryta-solution and the excess of baryta was precipitated by the current of carbon dioxide.

The filtrate of barium carbonate was concentrated by evaporation on a water bath at 50°C until the volume became one twentieth of the original serum. On the addition of pure alcohol, a white precipitate of bariumsalt of oxyproteic acid fraction was obtained. After drying, the precipitate was dissolved in water, freed from barium by sulphuric acid and neutralized with alkali.

The minimal lethal dosis of this serum oxyproteic acid solution contained 0.5 mg of nitrogen, which correspond to just the toxicity of urine oxyproteic acid fraction.

The amount of blood oxyproteic acid fraction of normal and nephrectomized rabbit (72 hours) was determined in terms of nitrogen contained in that fraction. The result shows that, while the blood oxyproteic acid nitrogen is 0.5 mg% in normal, it increased at 72 hours after the nephrectomy to 0.8–1.2 mg%.

## 3. *Discussion.*

I have shown above that the minimal lethal dosis of both urine and serum oxyproteic acid fraction for nephrectomized rabbit lies at 0.5 mg per kilo body weight. If we calculate the amount of oxyproteic acid nitrogen of blood in nephrectomized rabbit at the moment of the injection of 0.5 mg of oxyproteic acid fraction, it will amount to 1.3 mg%. As I have shown above already, the blood at the moment of death after the nephrectomy (about 70 hours after the operation) contained 0.8–1.2 mg of oxyproteic acid fraction nitrogen. It is very likely that the oxyproteic acid plays a great part in the cause of uremia. The determination of this fraction in a patient's serum may become very important in the medical clinic.

#### SUMMARY.

1. The toxicity of urine and serum constituents are studied with bilaterally nephrectomized rabbit.

2. After the bilateral nephrectomy the pH value of blood and carbon dioxide capacity tend to decrease steadily.

3. The blood volume increases after the bilateral nephrectomy.

4. The toxicity of urea, creatine and creatine is relatively small.

5. Among the constituents of urine, only the substance, the barium salt of which is soluble in water but insoluble in alcohol, is quite toxic. This substance does not belong to alkaloid or cholin, is inactivated by hydrolysis by acid, and is dialysable through collodion membrane.

6. The minimal lethal dosis (per Kilo body weight of nephrectomized rabbit) of oxyproteic acid fraction in a narrow sense contains 0.27–0.30 mg of nitrogen, while that of alloxypoteic acid fraction contains 3.28–3.30 mg N. This does not mean, however, that oxyproteic acid fraction proper is more toxic than alloxypoteic acid, as the nitrogen content of alloxypoteic acid far exceeds that of oxyproteic acid proper.

7. Oxyproteic acid fraction of serum has the same toxicity as that of urine.

8. The amount of oxyproteic acid in blood at 72nd hour after the bilateral nephrectomy, at the margin of uremic syndroms is 0.8–1.2 mg%. This nearly corresponds to the value, which will result by the intravenous injection of 0.5 mg of oxyproteic acid fraction nitrogen to the nephrectomized rabbit.

9. The estimation of serum oxyproteic acid fraction in clinical medicine is highly desirable.

I wish to express my sincere thanks to Prof. Dr. S. Kakiuchi for his kind advice throughout the course of the investigation.

#### REFERENCES.

- Allen, Scharf and Lundin (1925): *J. A. M. A.*, **85**, 1698.  
Andrews (1927): *Arch. Int. Med.*, **40**, 548.  
Bolliger und Breh (1928): *Zentralbl. inn. Med.*, 825.



- Bondzinski u. Gottlieb (1897): Zentralbl. f. d. med. Wissensch., 576.  
Browinski (1908): Hoppe-Seyler, 134.  
Chanutin and Silvette (1929): J. Biol. Chem., 85, 179.  
Imhäuser (1932): Zeitschr. f. exper. Med., 82, 552.  
Karsner, Bunker and Grabfield (1915): J. exp. M., 22, 544.  
Lyon, Shafton and Ivy (1929): Arch. int. Med., 44, 424.  
Ptaszek (1927): C. r. Soc. Biol., 96, 567.  
Roche (1929): Sang., 3, 657.  
Saso (1930): J. Biochem., 12, 281.  
Swingle (1928): Am. J. Phys., 86, 450.

## ÜBER DEN CALCIUM- UND PHOSPHORSTOFF- WECHSEL. I.

### Einfluss des Garotins und Gallosterins.

VON

INAO ISHIDA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama u. dem  
Zentralhospital Kurashiki.)

(Eingegangen am 6. August)

Es ist allgemein bekannt, dass das Vitamin D durch Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen aus Ergosterin gebildet wird und antirachitische Wirkung hat, indem es im Organismus bzw. in den Knochen Kalk und Phosphor ansetzt. Dieselbe Wirkung hat bekanntlich der Lebertran, in dem die Gegenwart von Vitamin D u. A festgestellt ist.

Was den Einfluss des Vitamins A auf den Kalk- sowie den Phosphorstoffwechsel anbetrifft, so haben viele Autoren wie Shipley u. sein Mitarbeiter (1921), Findlay u. MacKenzie (1922), Hess u. Weinstock (1924) und Chick u. Roscoe (1926) behauptet, dass die verringerte Verkalkung der Knochen bei der Rachitis dem Mangel des Vitamins A selbst in der Nahrung zuzuschreiben ist, während nach Mellanby (1919) und Hess u. seinem Mitarbeiter (1921, 1922) der antirachitische Faktor in der Nahrung nicht Vitamin A ist. Auch mir scheint das Vitamin A selbst eine Kalk- sowie Phosphoransatz im Organismus fördernde Wirkung zu haben. Bisher jedoch ist keine Rücksicht darauf genommen worden. In diesem Sinne habe ich den Einfluss des Gallosterins und des Carotins auf den Kalk- und Phosphorstoffwechsel untersucht, von denen das erstere nach Shimizu u. Hatakeyama (1929) u. Corneli (1930) eine Additionsverbindung von Vitamin A und Desoxycholsäure (Vitamin A-Choleinsäure) ist.

Betreffs der Wirkung der Gallensäure auf den Calcium- und Phosphorstoffwechsel soll nach Okii (1933) der mit der Nahrung

aufgenommene Kalk und Phosphor durch Zufuhr von Cholsäure unter ihrer positiven Bilanz im Körper angesetzt werden. So muss die Wirkung des Gallosterins auf den Kalk- sowie Phosphoransatz kombiniert mit der Wirkung von Vitamin A stärker sein, als entweder die Wirkung von Vitamin A oder von Gallensäure allein, wenn das Vitamin A eine den Kalk- sowie Phosphoransatz fördernde Wirkung hat.

Seit Euler u. Karrer (1929) und Kawakami u. Kimm (1929) ist heute allgemein bekannt, dass das Carotin ( $\alpha$  u.  $\beta$ ) eine Vitamin-A-Wirkung hat. Und nach Moore (1930) und Moore u. Belf (1932) soll das Vitamin A ein Umwandlungsprodukt des Carotins im Tierkörper sein.

Nach den neuesten Untersuchungen von Karrer (1932) u. Heilbron (1932) ist das Vitamin A ein Carotinderivat, welches in der Leber aus Carotin gebildet und mit der Formel  $C_{20}H_{30}O$  angegeben wird.

In diesem Sinne habe ich den Einfluss des  $\beta$ -Carotins auf den Calcium- und Phosphorstoffwechsel untersucht, indem die Bilanz des Calciums und des Phosphors durch ihre Ausscheidungen im Harn und Kot festgestellt wurde.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden ganz erwachsene, kräftige Kaninchen verwendet. Unter Zufuhr von Carotin oder Gallosterin wurde die Ausscheidung des Calciums und Phosphors im Harn und Kot untersucht, um die Bilanz zwischen ihrer gesamten Einnahme und Ausgabe festzustellen.

Die Versuche wurden in 3 Perioden, Vor-, Nach-, und Versuchsperiode, geteilt. In der Versuchsperiode wurde zuerst als Kontrolle 1,0 ccm reines Olivenöls subkutan, dann als eigentliche Versuche 1,0 ccm einer 0,1%igen Olivenöllösung des  $\beta$ -Carotins (Fp. =  $181^{\circ}$ — $181,5^{\circ}C$ ) oder 2-4-5 ccm einer 1%igen Gallosterinlösung, die mit N/10 Natronlauge neutralisiert gehalten wird, subkutan verabreicht, und so der Einfluss des  $\beta$ -Carotins und des Gallosterins auf die Bilanz des Kalkes sowie auf die des Phosphors beobachtet.

Den Kaninchen wurde täglich die gleiche Nahrung, 50 g Gerste, 20–50 g Gemüse und 50–70 ccm Wasser, verabreicht, und zwar zweimal, um 9 Uhr vormittags und um 4 Uhr nachmittags.

Der Kalkgehalt dieser Nahrung wurde nach der Veraschung auf trockenem Weg nach der Methode von De Waard (1919 u. 1924), und ihr Phosphorgehalt nach Neumann (1902–1905) alkalimetrisch bestimmt. Der Kalk- sowie Phosphorgehalt der täglichen Fäces und des Harns wurde nach Fuziwara (1931) behandelt und in genau gleicher Weise wie zuvor bestimmt.

Der Harn wurde täglich einmal mittels Katheter abgelassen und mit dem im Käfig gesammelten Harn vereinigt. Die Abgrenzung des Kotes ist mit Karmin in der Weise geschehen, dass ein wenig davon am Anfang oder am Ende jeder Periode mit der Nahrung verfüttert wurde.

### 1. Versuch mit Olivenölen (Kontrolle).

Nach Javillier u. Emerique (1929) wird die Xerophthalmie der Ratten durch Zufuhr von ungereinigtem Olivenöl geheilt, aber nicht durch die von gereinigtem. Die Untersuchung von Steenbock u. Daniel (1925) zeigte, dass das mit ultravioletten Strahlen bestrahlte Olivenöl auf den Kalkansatz im Organismus fördernd wirkt.

So wurde der Einfluss des Olivenöls auf die Bilanz des Kalkes und Phosphors zur Kontrolle untersucht.

Aus den Tabellen I u. II lässt sich ersehen, dass die Bilanz des Kalkes und des Phosphors durch Zufuhr von Olivenöl fast unbeeinflusst bleibt, indem dabei in jeder Periode immer eine positive Bilanz gezeigt wird.

### 2. Versuch mit $\beta$ -Carotin.

Aus den Tabellen III–V erhellt, dass die Phosphorausscheidung im Harn in zwei Fällen durch Zufuhr von Carotin vermindert, in einem Fall dagegen vermehrt wurde, während sie in der Nachperiode in allen Fällen deutlich vermindert wird.

Im Kot wird sie in allen Versuchen durch Zufuhr von Carotin vermindert, und diese verminderte Phosphorausscheidung bei

Zufuhr von Carotin tritt viel deutlicher in der Nachperiode auf als in der Versuchsperiode.

Die Bilanz des Phosphors wird also durch Zufuhr von Carotin gesteigert, und diese Steigerung tritt in der Nachperiode viel stärker ein, als in der Versuchsperiode.

Aus der Tabelle III ist ersichtlich, dass die negative Bilanz des Phosphors durch Zufuhr von Carotin sogar positiv wird.

Was die Kalkausscheidung im Kot und im Harn anbetrifft, so wurde gefunden, dass sie im Harn durch Zufuhr von Carotin zuerst herabgesetzt wird, um dann wieder den Anfangswert zu erreichen; im Kot wird sie ebenfalls durch Zufuhr von Carotin vermindert. Diese verminderte Kalkausscheidung im Kot bei Zufuhr von Carotin wird in der Nachperiode im Gegenteil wieder übernormal gesteigert, was besonders aus einem Versuch (Tabelle III) zu ersehen ist.

Die Bilanz des Kalkes wird also durch Zufuhr von Carotin gesteigert, wird aber in der Nachperiode durch vermehrte Ausscheidung des Kalkes im Kot negativ.

Gegenüber der negativen Kalkbilanz in der Nachperiode bleibt die Phosphorbilanz noch in der Nachperiode positiv.

### 3. Versuch mit Gallosterin.

Aus den Tabellen VI-IX ist ersichtlich, dass die Phosphorausscheidung im Harn mit einer Ausnahme von 4 Versuchen durch Zufuhr von Gallosterin vermehrt, dagegen im Kot ohne Ausnahme vermindert wird, was beim Versuch mit Gallensäure, einer Komponente des Gallosterins, von Sekitoo (1930) im Harn, von Fuziwaru (1931) und Okii (1932) im Kot bewiesen wurde.

Die Bilanz des Phosphors wird also durch Zufuhr von Gallosterin gesteigert, um wieder allmählich zum Wert der Anfangsbilanz abzusteigen. Die Kalkausscheidung im Harn und im Kot wird durch Zufuhr von Gallosterin auch herabgesetzt, um wieder allmählich zum Anfangswert zurückzukehren. Diese durch Gallosterin herabgesetzte Kalkausscheidung dauert ziemlich viele Tage lang, wie in den Tabellen VI-IX gezeigt wird.

Die Bilanz des Kalkes wird also durch die Wirkung des Gallo-



TABELLE I. Olivenöl.  
Nahrung: 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 cem Wasser.

Dat.	K.G.	Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemer- kungen		
		g	cem		Sp. G.	g	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	
								Harn.	Fäces.			Harn.			Fäces.
T/M	g														
21/II	2710.	73.	1020.	9,3	0,2339	0,0544	0,1630	+0,0165	0,3829	0,0261	0,3575	-0,0007			
23/ "	2705.	49.	1025.	9,3	0,2339	0,0466	0,1630	+0,0243	0,3829	0,0277	0,3575	-0,0023			
24/ "	2700.	45.	1025.	9,3	0,2339	0,0470	0,1630	+0,0239	0,3829	0,0182	0,3575	+0,0072			
Durchschnitt.					0,2339	0,0493	0,1630	+0,0216	0,3829	0,0240	0,3575	+0,0014	Olivenöl.		
24/ "	2655.	70.	1022.	6,8	0,2339	0,0418	0,1649	+0,0227	0,3829	0,0210	0,3586	+0,0033	1 cem		
25/ "	2610.	44.	1025.	6,8	0,2339	0,0462	0,1694	+0,0183	0,3829	0,0153	0,3586	+0,0090	"		
26/ "	2700.	31.	1030.	6,8	0,2339	0,0360	0,1694	+0,0283	0,3829	0,0130	0,3586	+0,0113	"		
Durchschnitt.					0,2339	0,0413	0,1694	+0,0232	0,3829	0,0164	0,3586	+0,0079			
27/ "	2690.	39.	1031.	9,4	0,2339	0,0380	0,1710	+0,0249	0,3829	0,0180	0,3344	+0,0305			
28/ "	2680.	67.	1028.	9,4	0,2339	0,0474	0,1710	+0,0155	0,3829	0,0270	0,3344	+0,0215			
1/III	2670.	62.	1025.	9,4	0,2339	0,0363	0,1710	+0,0266	0,3829	0,0248	0,3344	+0,0237			

TABELLE II. Olivenöl.

Nahrung: 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 cem Wasser.

Dat.	K.G.		Harn.		Fäces.	P. g			Ca. g			Bemer- kungen		
	T/M	g	cem	Sp. G.	g	Einnahme.	Ausgabe.	Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.	Bilanz.			
21/II	2660.		39.	1033.	8,8	0,2339	0,0490	0,1751	+0,0098	0,3829	0,0200	0,3545	+0,0084	
22/ "	2650.		44.	1030.	8,8	0,2339	0,0542	0,1751	+0,0046	0,3829	0,0202	0,3545	+0,0082	
23/ "	2615.		55.	1030.	8,8	0,2339	0,0623	0,1751	-0,0035	0,3829	0,0198	0,3545	+0,0086	
Durchschnitt.														
24/ "	2610.		50.	1030.	7,2	0,2339	0,0473	0,1640	+0,0226	0,3829	0,0150	0,3556	+0,123	1 cem
25/ "	2600.		69.	1025.	7,2	0,2339	0,0640	0,1640	+0,0059	0,3829	0,0215	0,3556	+0,0058	"
26/ "	2560.		75.	1026.	7,2	0,2339	0,0470	0,1640	+0,0229	0,3829	0,0227	0,3556	+0,0046	"
Durchschnitt.														
27/ "	2550.		63.	1026.	9,1	0,2339	0,0528	0,1640	+0,0171	0,3829	0,0197	0,3556	+0,0076	
28/ "	2560.		51.	1025.	9,1	0,2339	0,0543	0,1690	+0,0182	0,3829	0,0279	0,3413	+0,0137	
1/III	2556.		66.	1025.	9,1	0,2339	0,0403	0,1690	+0,0106	0,3829	0,0232	0,3413	+0,0184	
						0,2339	0,0403	0,1690	+0,0246	0,3829	0,0287	0,3413	+0,0129	

TABELLE III.  $\beta$ -Carotin.

Nahrung: 50 g Gerste, 20 g Gemüse u. 70 ccm Wasser.

Dat.	K. G.	Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemer- kungen
		ccm	Sp. G.		Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	
T/M	g			g	Nahrung.	Harn.	Fäces.		Nahrung.	Harn.	Fäces.		
29/IX	2460.	52.	1029.	21,9	0,2071	0,0575	0,1907	-0,0411	0,3480	0,0198	0,3908	-0,0626	
30/ "	2465.	59.	1025.	21,9	0,2071	0,0636	0,1907	-0,0472	0,3480	0,0214	0,9908	-0,0642	
1/X	2460.	44.	1030.	21,9	0,2071	0,0550	0,1907	-0,0386	0,3480	0,0205	0,3908	-0,0633	
2/ "	2460.	49.	1030.	21,9	0,2071	0,0599	0,1907	-0,0435	0,3480	0,0216	0,3908	-0,0632	
3/ "	2450.	51.	1030.	21,9	0,2071	0,1907	1,0377	-0,3480	0,8210	0,3908	0,0638	-0,0638	
4/ "	2450.	58.	1030.	21,9	0,2071	0,0602	0,1907	-0,0438	0,3480	0,0232	0,3908	-0,0660	
5/ "	2430.	60.	1025.	21,0	0,2071	0,0602	0,1907	-0,0438	0,3480	0,0207	0,3608	-0,0635	
Durchschnitt.					0,2071	0,0586	0,1907	-0,0422	0,3480	0,0212	0,3903	-0,0640	$\beta$ -Carotin
6/ "	2400.	42.	1030.	15,4	0,2071	0,0455	0,1531	+0,0085	0,3480	0,0125	0,3003	+0,0352	1 mg
7/ "	2390.	33.	1030.	15,4	0,2071	0,0452	0,1531	+0,0088	0,3480	0,0099	0,3003	+0,0378	"
8/ "	2400.	34.	1030.	15,4	0,2071	0,0412	0,1531	+0,0128	0,3480	0,0097	0,3003	+0,0380	"
9/ "	2430.	36.	1030.	15,4	0,2071	0,0432	0,1531	+0,0108	0,3480	0,0109	0,3003	+0,0368	"
Durchschnitt.					0,2071	0,0438	0,1531	+0,0102	0,3480	0,0108	0,3003	+0,0369	
10/ "	2410.	28.	1032.	15,6	0,2071	0,0228	0,0710	+0,1133	0,3480	0,0161	0,4742	-0,1423	
11/ "	2400.	26.	1032.	15,6	0,2071	0,0177	0,0710	+0,1184	0,3480	0,0155	0,4742	-0,1417	
12/ "	2400.	25.	1032.	15,6	0,2071	0,0124	0,0710	+0,1237	0,3480	0,0131	0,4742	-0,1393	
13/ "	2420.	23.	1032.	15,6	0,2071	0,0256	0,0710	+0,1105	0,3480	0,0155	0,4742	-0,1417	

TABELLE IV.  $\beta$ -Carotin.

Nahrung: 50 g Gerste, 20 g Gemüse u. 70 ccm Wasser.

Dat.	K.G.	Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemerkungen	
		ccm	Sp. G.		g	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.			Bilanz.
							Harn.	Fäces.			Nahrung.	Harn.		
T/M	g													
29/IX	2500.	63.	1030.	19,6	0,2071	0,0533	0,1521	+0,0017	0,3480	0,0172	0,3059	+0,0249		
30/ "	2520.	62.	1025.	19,6	0,2071	0,0518	0,1521	+0,0032	0,3480	0,0161	0,3059	+0,0260		
1/X	2530.	56.	1030.	19,6	0,2071	0,0612	0,1521	-0,0062	0,3480	0,0141	0,3059	+0,0280		
2/ "	2500.	49.	1030.	19,6	0,2071	0,0507	0,1521	+0,0043	0,3480	0,0138	0,3059	-0,0283		
3/ "	2500.	50.	1025.	19,6	0,2071	0,0550	0,1521	+0,0000	0,3480	0,0131	0,3059	+0,0290		
4/ "	2510.	44.	1025.	19,6	0,2071	0,0457	0,1521	+0,0093	0,3480	0,0128	0,3059	+0,0293		
5/ "	2480.	64.	1025.	19,6	0,2071	0,0552	0,1521	-0,0002	0,3480	0,0145	0,3056	+0,0276		
Durchschnitt.														
6/ "	2500.	49.	1030.	16,7	0,2071	0,0604	0,0680	+0,0787	0,3480	0,0137	0,2835	+0,0508	β-Carotin	
7/ "	2455.	40.	1030.	16,7	0,2071	0,0305	0,0680	+0,1086	0,3480	0,0090	0,2835	+0,0555	1 mg	
8/ "	2450.	41.	1030.	16,7	0,2071	0,0492	0,0680	+0,0899	0,3480	0,0089	0,2835	+0,0556	"	
9/ "	2465.	32.	1030.	16,7	0,2071	0,0414	0,0680	+0,0977	0,3480	0,0115	0,2835	+0,0530	"	
Durchschnitt.														
10/ "	2490.	24.	1032.	15,7	0,2071	0,0454	0,0680	+0,0937	0,3480	0,0108	0,2835	+0,0537		
11/ "	2460.	27.	1032.	15,7	0,2071	0,0285	0,0643	+0,1143	0,3480	0,0157	0,3710	-0,0387		
12/ "	2460.	29.	1030.	15,7	0,2071	0,0257	0,0643	+0,1171	0,3480	0,0173	0,3710	-0,0403		
13/ "	2450.	30.	1030.	15,7	0,2071	0,0237	0,0643	+0,1191	0,3480	0,0184	0,3710	-0,0414		
					0,2071	0,0299	0,0643	+0,1129	0,3480	0,0227	0,3710	-0,0457		

TABELLE V.  $\beta$ -Carotin.

Nahrung: 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 ccm Wasser.

Dat.	K.G.		Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemerkungen
	T/M	g	ccm	Sp. G.	g	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	
						Nahrung.	Harn.	Fäces.		Nahrung.	Harn.	Fäces.		
17/XII	2625.		79.	1029.	8,14	0,2339	0,0825	0,1282	+0,0232	0,3829	0,0238	0,3565	+0,0026	
18/ "	2590.		78.	1028.	8,14	0,2339	0,0770	0,1282	+0,0237	0,3829	0,0214	0,3565	+0,0050	
19/ "	2655.		75.	1030.	8,14	0,2339	0,0957	0,1282	+0,0100	0,3829	0,0260	0,2565	+0,0004	
20/ "	2555.		47.	1030.	8,14	0,2339	0,0514	0,1282	+0,0543	0,3829	0,0196	0,2565	+0,0068	
Durchschnitt.														
21/XII	2585.		55.	1032.	8,10	0,2339	0,0648	0,1010	+0,0681	0,3829	0,0127	0,2546	+0,1156	$\beta$ -Carotin
22/ "	2570.		77.	1020.	8,10	0,2339	0,0753	0,1010	+0,0576	0,3829	0,0134	0,2546	+0,1149	1,0 mg
23/ "	2600.		64.	1025.	8,10	0,2339	0,0801	0,1010	+0,0528	0,3829	0,0082	0,2546	+0,1201	"
24/ "	2615.		94.	1025.	8,10	0,2339	0,0915	0,1010	+0,0414	0,3829	0,0133	0,2546	+0,1150	"
Durchschnitt.														
25/ "	2590.		69.	1025.	6,32	0,2339	0,0564	0,0601	+0,1174	0,3829	0,0263	0,3697	-0,0131	
26/ "	2560.		46.	1032.	6,32	0,2339	0,0286	0,0601	+0,1452	0,3829	0,0182	0,3697	-0,0050	
27/ "	2565.		52.	1025.	6,32	0,2339	0,0246	0,0601	+0,1492	0,3829	0,0194	0,3697	-0,0062	
28/ "	2560.		47.	1026	6,32	0,2339	0,0221	0,0601	+0,1517	3,3829	0,0183	0,3697	-0,0051	



TABELLE VI. Gallosterin.

Nahrung: 50 g Gerste, 60 g Gemüse u. 50 ccm Wasser.

Dat.	K.G.	Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemer- kungen
		ccm	Sp. G.		Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	
T/M	g				Nahrung.	Harn.	Fäces.		Nahrung.	Harn.	Fäces.		
13/ I	2590.	82.	1020.	6,35	0,2339	0,0581	0,1785	-0,0127	0,3829	0,0222	0,3359	+0,0248	
14/ "	2595.	81.	1020.	6,35	0,2339	0,0680	0,1785	-0,0126	0,3829	0,0253	0,3359	+0,0217	
15/ "	2585.	64.	1025.	6,35	0,2339	0,0658	0,1785	-0,0104	0,3829	0,0308	0,3359	+0,0162	
16/ "	2590.	64.	1025.	6,35	0,2339	0,0520	0,1785	+0,0034	0,3829	0,0284	0,3359	+0,0186	
Durchschnitt.					0,2339	0,0635	0,1785	-0,0081	0,3829	0,0267	0,3359	+0,0203	Gallosterin
17/ I	2555.	78.	1020.	11,2	0,2339	0,0612	0,1392	+0,0335	0,3829	0,0261	0,2448	+0,1120	20 mg
18/ "	2560.	60.	1020.	11,2	0,2339	0,0508	0,1392	+0,0439	0,3829	0,0189	0,2448	+0,1192	20 mg
19/ "	2540.	73.	1020.	11,2	0,2339	0,0428	0,1392	+0,0519	0,3829	0,0144	0,2448	+0,1237	20 mg
20/ "	2545.	64.	1025.	11,2	0,2339	0,0417	0,1392	+0,0530	0,3829	0,0152	0,2448	+0,1229	20 mg
Durchschnitt.					0,2339	0,0491	0,1392	+0,0456	0,3829	0,0187	0,2448	+0,1154	
21/ L	2540.	65.	1025.	8,5	0,2339	0,0331	0,1464	+0,0544	0,3829	0,0113	0,3135	+0,0581	
22/ "	2550.	72.	1020.	8,5	0,2339	0,0374	0,1464	+0,0501	0,3829	0,0297	0,3135	+0,0397	
23/ "	2545.	69.	1028.	8,5	0,2339	0,0530	0,1464	+0,0345	0,3829	0,0275	0,3135	+0,0419	
24/ "	2540.	69.	1025.	8,5	0,2339	0,0458	0,1464	+0,0417	0,3829	0,0278	0,3135	+0,0416	

TABELLE VII. Gallosterin.

Nahrung: 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 cem Wasser.

Dat.	K.G.	Harn		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemerkungen
		T/M	g	cem	Sp. G.	g	Einnahme.	Ausgabe.	Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.	Bilanz.	
							Nahrung.	Harn.	Fäces.	Nahrung.	Harn.	Fäces.	
13/ I	2500.			78.	1030.	4,65	0,2339	0,460	0,1641	0,3829	0,0223	0,3082	+0,0524
14/ "	2495.			81.	1020.	4,65	0,2339	0,484	0,1641	0,3829	0,0300	0,0447	+0,0447
15/ "	2545.			56.	1031.	4,65	0,2339	0,0316	0,1641	0,3829	0,0452	0,3082	+0,0295
16/ "	2550.			88.	1030.	4,65	0,2339	0,0666	0,1641	0,3829	0,0412	0,3082	+0,0335
Durchschnitt.							0,2339	0,0482	0,1641	0,3829	0,0347	0,3082	+0,0400
17/ I	2560.			69.	1030.	8,35	0,2339	0,0713	0,1064	0,3829	0,0249	0,1895	+0,1685
18/ "	2550.			82.	1021.	8,33	0,2339	0,0780	0,1064	0,3829	0,0315	0,1895	+0,1619
19/ "	2540.			65.	1025.	8,33	0,2339	0,0785	0,1064	0,3829	0,0171	0,1895	+0,1763
20/ "	2560.			75.	1030.	8,33	0,2339	0,0717	0,1064	0,3829	0,0141	0,1895	+0,1793
Durchschnitt.							0,2339	0,0724	0,1064	0,3829	0,0219	0,1895	+0,1715
21/ I	2550.			76.	1028.	7,35	0,2339	0,0752	0,1318	0,3829	0,0216	0,3140	+0,0473
22/ "	2510.			76.	1025.	7,35	0,2339	0,0794	0,1318	0,3829	0,0282	0,3140	+0,0407
23/ "	2500.			75.	1025.	7,35	0,2339	0,0764	0,1318	0,3829	0,0298	0,3140	+0,0391
24/ "	2500.			69.	1028.	7,35	0,2339	0,0674	0,1318	0,3829	0,0325	0,3140	+0,0364

Gallosterin

20 mg

"

"

"

TABELLE VIII. Gallosterin.

Nahrung: 50 g Gerste, 20 g Gemüse u. 50 cem Wasser.

Dat.	K.G.	Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemer- kungen
		g	cem	Sp. G.	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	
T/M					Nahrung.	Harn.	Fäces.		Nahrung.	Harn.	Fäces.		
1/II	2560.	45.	1025.	7,15	0,2339	0,0426	0,1840	+0,0073	0,3829	0,0209	0,3566	+0,0054	
2/ "	2555.	35.	1032.	7,15	0,2339	0,0413	0,1840	+0,0086	0,3829	0,0182	0,3566	+0,0081	
3/ "	2565.	54.	1025.	7,15	0,2339	0,0489	0,1840	+0,0010	0,3829	0,0287	0,3566	+0,0084	
4/ "	2585.	45.	1025.	7,15	0,2339	0,0411	0,1840	+0,0088	0,3829	0,0189	0,3566	+0,0074	
Durchschnitt.					0,2339	0,0435	0,1840	+0,0064	0,3829	0,0202	0,3566	+0,0061	Gallosterin
5/II	2585.	56.	1025.	8,80	0,2339	0,0647	0,1652	+0,0040	0,3829	0,0134	0,2349	+0,1346	50 mg
6/ "	2555.	55.	1025.	8,80	0,2339	0,0584	0,1652	+0,0103	0,3829	0,0088	0,2349	+0,1392	"
7/ "	2560.	69.	1028.	8,80	0,2339	0,0477	0,1652	+0,0210	0,3829	0,0099	0,2349	+0,1381	"
3/ "	2555.	45.	1030.	8,80	0,2339	0,0468	0,1652	+0,0219	0,3829	0,0071	0,2349	+0,1409	"
Durchschnitt.					0,2339	0,0543	0,1652	+0,0144	0,3829	0,0105	0,2349	+0,1375	
9/II	2550.	40.	1030.	8,32	0,2339	0,0406	0,1676	+0,0257	0,3829	0,0266	0,3189	+0,0374	
10/ "	2540.	34.	1030.	3,32	0,2339	0,0416	0,1676	+0,0247	0,3829	0,0149	0,3189	+0,0491	
11/ "	2630.	35.	1025.	8,32	0,2339	0,0490	0,1676	+0,0173	0,3829	0,0175	0,3189	+0,0465	
12/ "	2620.	32.	1030.	8,32	0,2339	0,0369	0,1676	+0,0294	0,3829	0,0164	0,3189	+0,0476	

TABELLE IX. Gallosterin.

Nahrung: 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 ccm Wasser.

Dat.	K.G.	Harn.		Fäces.	P. g				Ca. g				Bemerkungen
		ccm	Sp. G.		g	Einnahme.	Ausgabe.		Bilanz.	Einnahme.	Ausgabe.		
T/M	g				Nahrung.	Harn.	Fäces.		Nahrung.	Harn.	Fäces.		
1/II	2060.	42.	1030.	7,32	0,2339	0,0471	0,1908	-0,0040	0,3829	0,0179	0,3630	+0,0020	
2/ "	2055.	35.	1030.	7,32	0,2339	0,0395	0,1908	+0,0036	0,3829	0,0162	0,3630	+0,0037	
3/ "	2065.	40.	1030.	7,32	0,2339	0,0365	0,1908	+0,0066	0,3829	0,0222	0,3630	-0,0023	
4/ "	2115.	54.	1025.	7,32	0,2339	0,0361	0,1908	+0,0070	0,3829	0,0243	0,3630	-4,0044	
Durchschnitt.													
5/II	2115.	44.	1030.	10,0	0,2339	0,0474	0,1566	+0,0299	0,3829	4,0121	0,2627	+0,1081	Galioſterin
6/ "	2090.	54.	1025.	10,0	0,2339	0,0457	0,1566	+0,0316	0,3829	0,0099	0,2627	+0,1103	40 mg
7/ "	2080.	67.	1028.	10,0	0,2339	0,0389	0,1566	+0,0384	0,3829	0,0111	0,2627	+0,1091	"
8/ "	2060.	56.	1023.	10,0	0,2339	0,0325	0,1566	+0,0448	0,3829	0,0089	0,2627	+0,1103	"
Durchschnitt.													
9/II	2055.	50.	1028.	7,37	0,2339	0,0411	0,1566	+0,0362	0,3829	0,0105	0,1097	+0,1097	
10/ "	2060.	41.	1030.	7,37	0,2339	0,0332	0,1691	+0,0316	0,3829	0,0101	0,3396	+0,0432	
11/ "	2050.	52.	1030.	7,37	0,2339	0,0358	0,1691	+0,0290	0,3829	0,0109	0,3396	+0,0324	
12/ "	2060.	45.	1030.	7,37	0,2339	0,0354	0,1691	+0,0294	0,3829	0,0146	0,3396	+0,0287	
										0,3369	0,0189	+0,0244	

Gal'osterin

40 mg

"

"

"

sterins gesteigert, und diese gesteigerte Bilanz des Kalkes dauert in der Nachperiode ziemlich viele Tage lang fort.

Die Steigerung der Kalkbilanz tritt bei Zufuhr von Gallosterin viel stärker auf als bei Zufuhr von Gallensäure allein (Siehe Versuch von Okii: *Jl. of Bioch.* 18, 45, 1933).

Diese Steigerung der Kalkbilanz bei Zufuhr von Gallosterin ist, so scheint mir höchstwahrscheinlich auf die Mitwirkung der Gallensäure und des Vitamins A zurückzuführen. Ein weiterer Unterschied in der Wirkung zwischen Gallensäure und Gallosterin ergibt sich, indem die Kalkausscheidung im Harn durch Zufuhr von Gallensäure vermehrt, aber durch die von Gallosterin vermindert wird, welch, ersteres von Sekitoo(1930) bewiesen wurde.

Diese Wirkung des Gallosterins scheint höchstwahrscheinlich hauptsächlich auf der Wirkung von Vitamin A zu beruhen, was auch bei Zufuhr von Carotin der Fall ist, welches als Vorstufe von Vitamin A betrachtet wird.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Durch subkutane Zufuhr von  $\beta$ -Carotin wird die positive Bilanz des Kalkes sowie des Phosphors bei Kaninchen gesteigert, und ihre negative Bilanz wird dadurch sogar positiv.

2. Diese durch die Wirkung von  $\beta$ -Carotin gesteigerte positive Bilanz des Phosphors bleibt nach dem Aufhören der  $\beta$ -Carotin-Zufuhr viele Tage lang und wird noch verstärkt, während die des Kalkes im Gegenteil nach dem Aufhören der  $\beta$ -Carotin-Zufuhr negativ wird.

3. Die positive Bilanz des Kalkes sowie des Phosphors wird durch Zufuhr von Gallosterin (Vitamin A-Choleinsäure) gesteigert, und ihre negative Bilanz wird dadurch auch positiv.

4. Diese durch Gallosterin gesteigerte Phosphorbilanz kehrt nach dem Aufhören der Gallosterin-Zufuhr wieder zum Anfangsbilanzwert zurück, während die Kalkbilanz ziemlich viele Tage lang gesteigert bleibt.

5. Diese die Kalkbilanz steigernde Wirkung tritt bei Zufuhr des Gallosterins viel stärker auf, als bei Zufuhr der Gallensäure.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Vitamin A und Carotin



eine den Kalk- sowie den Phosphoransatz im Körper fördernde Wirkung haben.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlen, Herrn Direktor S. Wada in der Pädiatrischen Klinik des Zentralhospitals Kurashiki meinen herzlichen Dank für die Förderung bei dieser Arbeit auszusprechen.

## LITERATUR.

- Chick, A. F. u. Roscoe, M. H. (1926): *Bioch. Jl.*, **20**, 137.  
Corneli, W. (1930): *Zeitschr. physiolog. Chem.*, **191**, 86.  
De Waard, D. T. (1919 u. 1923): *Bioch. Zschr.*, **97**, 176. u. **135**, 581.  
Euler, B. u. H. u. Karrer, P. (1929): *Helv. Chim. Acta.*, **12**, 278.  
Findlay, G. M. u. MacKenzie, R. (1922): *Jl. Path. u. Bakt.*, **25**, 402.  
Fuziwara, K. (1931): *Jl. of Bioch.*, **13**, 465.  
Hess, A. F. u. Weinstock, M. (1924): *Jl. Biolog. Chem.*, **62**, 301.  
Hess, A. F., McCann, G. F. u. Pappenheimer, A. M. (1921): *Jl. Biolog. Chem.*, **47**, 395.  
Hess, A. F. u. Unger, L. J. (1922): *Jl. amer. Med. Assoc.*, **78**, 1596.  
Hess, A. E., Unger, L. J. u. Pappenheimer, A. M. (1922): *Jl. of exper. Med.*, **35**, 427.  
Heilbron, I. M., Heslop, R. N., Morton, R. A., Webster, E. T. und Rea, T. L. u. Drumond, J. C. (1932): *Bioch. Jl.*, **26**, 1178.  
Heilbron, I. M., Morton, R. A. u. Webster, E. T. (1932): *Bioch. Jl.*, **26**, 1194.  
Javillier, M. Emerique, L. (1929): *Bull. Soc. Scien. d'Hyg. Alim.*, **17**, 420.  
Karrer, P., Morf. u. Schöpf. (1932): *Helv. Chim. Acta.*, **14**, 1036 u. 1431.  
Kawakami, K. u. Kimm, R. (1929): *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, **5**, 213.  
Mellanby, E. (1919): *Jl. of Physiol.*, **52**, 53.  
Moore, Th. (1930): *Bioch. Jl.*, **24**, 692.  
Moore, Th. u. Belf. D. Sc. (1932): *Lancet*, **223**, 13.  
Neumann, A. (1902/3–1904/5): *Zschr. physiolog. Chem.*, **37**, 129 u. **43**, 35.  
Okii, I. (1932): *Jl. of Bioch.*, **16**, 217.  
Okii, I. (1933): *Jl. of Bioch.*, **18**, 45.  
Sekitoo, T. (1930): *Jl. of Bioch.*, **11**, 251.  
Shimizu, T. u. Hatakeyama, T. (1929): *Zeitschr. physiolog. Chem.*, **182**, 57.  
Shipley, P. G., Park, E. A., McCollum, E. V. u. Simonds, N. (1921): *Proc. Soc. exper. Biolog. u. Med.*, **18**, 277.  
Shipley, P. G., Park, E. A., McCollum, E. V. u. Parsons, T. (1921): *Jl. Biolog. Chem.*, **45**, 343.  
Steenbock, H. u. Daniel, A. L. (1925): *Jl. Amer. Med. Assoc.*, **84**, 1093.



## INDEX TO VOLUME XVIII.

### A

- Adowa, A. N. und Smorodinzew, J. A.  
Die Wirkung von Pepsinpräparaten verschiedener Aktivität auf Muskelglobuline und Kollagen. 325.
- Alkoholoxydase, Beiträge zur Kenntnis der — 243.
- Aminosäure, Zum Desaminierungsvorgang der — n im tierischen Organismus. 395.
- Animal tissue, Influence of glutathione and moniodoacetic acid on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by — — a. 445.

### B

- $\beta$ -naphtholglucuronic acid, A micro-method of determination of menthol, borneol, and — in blood. 259.
- Blood, A microcolorimetric method of determination of free and conjugated menthol in — and tissues. 277.
- Blood, A micromethod of determination of menthol-, borneol- and  $\beta$ -naphtholglucuronic acid in —. 259.
- Blut, Beiträge zur Cholesterinbestimmung im —. 227, 237.
- Blutbromgehalt, Über Beziehungen zwischen — und inneren Sekretion. 417.
- Blutgallensäure, Beiträge zur Bestimmung der — n. 345.
- Blutserum, Eine neue in der Praxis leicht ausführbare Bestimmungsmethode der Gallensäuren im

—. 345.

- Borneol, A micromethod of determination of menthol-, — and  $\beta$ -naphtholglucuronic acid in blood. 259.
- Bromstoffwechsel, Klinische und experimentelle Untersuchungen über —. 417.

### C

- Calcium, Die — und Phosphorsäurebilanz der Hündin bei Zufuhr von Gallensäure. 45.
- Calcium, Über den — und Phosphorstoffwechsel. Einfluss des Garotins und Gallosterins. 479.
- Calciumstoffwechsel, Über den Einfluss der Gallensäure auf den —. 45.
- Calomel electrode, Some notes on the — —. 301.
- Canalin, The constitution of —. 333.
- Canavanin, Studies on a diamino acid, —. 333.
- Carbohydrate, Biochemical studies on —. 259, 277.
- Carotin, Über den Calcium- und Phosphorstoffwechsel. Einfluss des — s und Gallosterins. 479.
- Chlorine, The non-solvent space of the serum and the — bound by the serum protein. 107.
- Cholesterin-Gehalt, Über den — — der Muskulatur. 163.
- Cholesterinbestimmung, Beiträge zur — im Blut. 227, 237.
- Cholsäure, Beiträge zur Kenntnis der Hammarstensen'schen Reaktion der —. 311.

## D

- Diamino acid, Studies on a ———  
——, canavanin. 333.  
Diazo-body, Studies on the ——— in  
typhoid urine. 379.  
Digitoninmethode, Über die Kombina-  
tion der kolorimetrischen mit der  
——. 237.

## E

- Eiweissstoffwechsel, Der Einfluss der  
Temperatur auf den ———. 387.  
Ergosterin, Glykocholie bei Zufuhr  
von ——— und seinem Benzoat und  
das vegetative Nervensystem. 33.  
Ergosterin und Vitamin D. 1.  
Extraktionsmethode, Kritische Be-  
merkungen über einige ———n und  
eine vereinfachte gravimetrische  
Bestimmungsmethode. 227.  
Extraktivstoffe, Die stickstoffhaltigen  
—— der Krötenleber während  
der Winterzeit. 387.

## F

- Farbenreaktion, Über die ——— von  
Strychnin und Strychninnitrat.  
153.  
Fermentative Hydrolyse, Über die  
—— der Hexosidphosphor-  
säureester. 125.  
Fisch, Über den Cholesterin-Gehalt  
der Muskulatur von ———en. 163.  
FUJIWARA, Hidekatsu. Über die Far-  
benreaktionen von Strychnin und  
Strychninnitrat. 153.

## G

- Galle, Einfluss der Milz auf die  
——n und Gallensäureaus-  
scheidung. 369.  
Gallensäure, Bedeutung über ——— im  
Kohlehydratstoffwechsel. 33, 207.

Gallensäure, Die Calcium- und Phos-  
phorsäurebilanz der Hündin bei  
Zufuhr von ———. 45.

Gallensäure, Eine neue in der Praxis  
leicht ausführbare Bestimmungs-  
methode der ———n im Blutserum.  
345.

Gallensäure, Einfluss der ——— auf  
die enzymatische Spaltung von  
Lecithin. 63.

Gallensäure, Über den Einfluss der  
—— auf den Calciumstoffwechsel.  
45.

Gallensäure, Über den Einfluss der  
—— auf die Gewebsoxydation  
und auf die Kohlenhydratver-  
brennung. 207.

Gallensäureausscheidung, Einfluss der  
Milz auf die Gallen und ———.  
369.

Gallensäureausscheidung, Reisembryo  
und ———. 15.

Gallensäurebildung, Über die ———.  
15.

Gallosterin, Über den Calcium- und  
Phosphorstoffwechsel. Einfluss  
des Carotins und Gallosterins.  
479.

Gamo, Yoshio. On the toxicity of  
urine and serum proteic acid  
fraction. 457.

Gastropodeneier, Chemie der ———.  
145.

Gewebsoxydation, Über den Einfluss  
der Gallensäure auf die ——— und  
auf die Kohlenhydratverbren-  
nung. 207.

Glutathion, Influence of ——— and  
monoiodoacetic acid on the pro-  
duction of lactic acid from  
hexosediphosphoric acid by ani-  
mal tissues. 445.

Glutathion, On the method of quanti-  
tative estimation of ——— in  
tissues. 75.

Glykocholie bei Zufuhr von Ergosterin

und seinem Benzoat und das vegetative Nervensystem. 33.

Gravimetrische Bestimmungsmethode, Kritische Bemerkungen über einige Extraktionsmethoden und eine vereinfachte ——. 227.

## H

Hammarstensen'sche Reaktion, Beiträge zur Kenntnis der — der Cholsäure. 311.

Hämolyse, Beiträge zum Studium der Phosphatasen und über die phosphatische —. 23.

HAYASIDA, ATUSI. The non-solvent space of the serum and the chlorine bound by the serum protein. 107.

Hexosediphosphoric acid, Influence of glutathione and moniodoacetic acid on the production of lactic acid from — by animal tissues. 445.

Hexosidphosphorsäure, Über die fermentative Hydrolyse der —. 125.

Hühnergalle, Vorkommen der Taurocholsäure in der —. 323.

Hydrolyse, Über die fermentative — der Hexosidphosphorsäure-ester. 125.

## I

ICHIHARA, MASAO. Über die Phosphamidase. 87.

Innere Sekretion, Über Beziehungen zwischen Blutbromgehalt und —. 417.

ISHIDA, INAO. Über den Calcium- und Phosphorstoffwechsel. Einfluss des Carotins und Gallosterins. 479.

## K

KITAGAWA, Matsunosuke and MONOBE, Shin-ichi. Studies on a diamino acid, canavanin. III. The constitution of canalin. 333.

Kohlenhydratstoffwechsel, Bedeutung über Gallensäure im —. 207.

Kohlenhydratstoffwechsel, Die Bedeutung der Gallensäure im —. 33.

Kohlenhydratverbrennung, Über den Einfluss der Gallensäure auf die Geweboxydation und auf die —. 207.

Kollagen, Die Wirkung von Pepsinpräparaten verschiedener Aktivität auf Muskelglobuline und —. 325.

KOTAKE, Y. sr., KOTAKE, Y. jr. und TANIGUCHI, I. Zum Desaminierungsvorgang der Aminosäuren im tierischen Organismus. 395.

KOTAKE, Y. jr., KOTAKE, Y. sr. und TANIGUCHI, I. Zum Desaminierungsvorgang der Aminosäuren im tierischen Organismus. 395.

Krötenleber, Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der — während der Winterzeit. 387.

KUMON, TEKI. Chemie der Gastropodeneier. 145.

KURANAMI, Teikichi. Klinische und experimentelle Untersuchungen über Bromstoffwechsel. II. Über Beziehungen zwischen Blutbromgehalt und innerer Sekretion. 417.

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Bestimmung der Blutgallensäuren. II. Mitteilung. Eine neue in der Praxis leicht ausführbare Bestimmungsmethode der Gallensäuren im Blutserum. 345.

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Cholesterinbestimmung im Blut.



I. Kritische Bemerkungen über einige Extraktionsmethoden und eine vereinfachte gravimetrische Bestimmungsmethode. 227.

II. Über die Kombination der kolorimetrischen mit der Digintoninmethode. 237.

## L

Lactic acid, Influence of glutathione and moniodoacetic acid on the production of — from hexosediphosphoric acid by animal tissues. 445.

Leithin, Einfluss der Gallensäure auf die enzymatische Spaltung von —. 63.

## M

MAKINO, Hiroshi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweissstoffwechsel. II. Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber während der Winterzeit. 387.

MALHOTRA, R. C. A contribution to the biochemistry of seed germination with particular reference to zea mays. 173.

MALHOTRA, R. C. A contribution to the biochemistry of the wheat plant. 199.

MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates.

I. A micromethod of determination of menthol-, borneol- and  $\beta$ -naphtholglucuronic acid in blood. 259.

II. A microcolorimetric method of determination of free and conjugated menthol in blood and tissues. 277.

Menthol, A microcolorimetric method of determination of free and conjugated — in blood and

tissues. 277.

Menthol, A micromethod of determination of —, borneol and  $\beta$ -naphtholglucuronic acid in blood. 259.

Microcolorimetric method, A — of determination of free and conjugated menthol in blood and tissues. 277.

Micromethod, A — of determination of menthol-, borneol- and  $\beta$ -naphtholglucuronic acid in blood. 259.

Milz, Einfluss der — auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung. 369.

MIZAZAKI, Masaki. Studies on the diazo-body in typhoid urine. 379.

MIZUSAWA, Hitoshi. Beiträge zur Kenntnis der Alkoholoxydase. 243.

MONOBE, Shin-ichi, and KITAGAWA, Matsunosuke. Studies on a diamino acid, canavanin. III. The constitution of canalin. 333.

Monoiodoacetic acid, Influence of glutathione and — on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by animal tissues. 445.

MUNEMURA, Sanmatsu. Beiträge zum Studium der Phosphatasen und über die phosphatische Hämolyse. 23.

Muskelglobuline, Die Wirkung von Pepsinpräparaten verschiedener Aktivität auf — und Kollagen. 325.

Muskulatur, Über den Cholesterin-Gehalt der — von Fischen. 163.

## N

NAMIKI, Shishiro. Über den Chole

sterin Gehalt der Muskulatur von Fischen. 163.

Nervensystem, Glykochole bei Zufuhr von Ergosterin und seinem Benzozat und das vegetative —. 33.

NOMURA, KENTARO. Some notes on the calomel electrode. 301.

## O

OGAWA, Masayoshi, and OKUDA Yuzuru. On the method of quantitative estimation of glutathione in tissues. 75.

OHMIYA, Seiichi. Über die fermentative Hydrolyse der Hexosidphosphorsäureester. 125.

OKII, Isokichi. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel. VII. Die Calcium- und Phosphorsäurebilanz der Hunden bei Zufuhr von Gallensäure. 45.

OKUDA, Yuzuru, and OGAWA, Masayoshi. On the method of quantitative estimation of glutathione in tissues. 75.

## P

Pepsinpräparaten, Die Wirkung von — verschiedener Aktivität auf Muskelglobuline und Kollagen. 325.

Phosphamidase, Über die —. 87.

Phosphatase, Beiträge zum Studium der — und über die phosphatische Hämolyse. 23.

Phosphorsäurebilanz. Die Calcium- und — der Hündin bei Zufuhr von Gallensäure. 45.

Phosphorstoffwechsel, Über den Calcium- und — Einfluss des Carotins and Gallosterins. 479.

Proteic acid, On the toxicity of urine and serum —. 457.

## R

Reisembryo, Über die Sterine des —s. 1.

Reisembryo und Gallensäure. 15.

## S

Seed germination, A contribution to the biochemistry of — — with particular reference to zeamays. 173.

Serum, On the toxicity of urine and — proteic acid fraction. 457.

Serum, The non-solvent space of the — and the chlorine bound by the serum protein. 107.

Serum protein, The non-solvent space of the serum and the chlorine bound by the — —. 107.

SMORODINZEW, J. A. und ADOWA, A. N. Die Wirkung von Pepsinpräparaten verschiedener Aktivität auf Muskelglobuline und Kollagen. 325.

Stability of electrode potential, The degree of — — — and its effect on the relation between pH and E.M.F. 285.

Sterine, Über die — des Reisembryos. 1.

Stick antimony electrode, Studies on the — — —. 285.

Strychnin, Über die Farbenreaktionen von — und Strychninnitrat. 153.

Strychninnitrat, Über die Farbenreaktionen von Strychnin und —. 153.

## T

TAKATA, Hiroshi. Einfluss der Gallensäure auf die enzymatische Spaltung von Lecithin. 63.

TANAKA, Keizo. Über die Sterine

- des Reisembryos. (II). Ergosterin und Vitamin D. 1.
- TANAKA, Keizo und TANAKA, Toshiyuki. Über die Gallensäurebildung. VI. Reisembryo und Gallensäureausscheidung. 15.
- TANAKA, Toshiyuki. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXVIII. Glykocholie bei Zufuhr von Ergosterin und seinem Benzoat und das vegetative Nervensystem. 33.
- TANAKA, Toshiyuki. Einfluss der Milz auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung. 369.
- TANAKA, Toshiyuki und TANAKA, Keizo. Über die Gallensäurebildung. VI. Reisembryo und Gallensäureausscheidung. 15.
- TANIGUCHI, I. Zum Desaminierungsvorgang der Aminosäuren im tierischen Organismus. 395.
- Taurocholsäure, Vorkommen der — in der Hühnergalle. 323.
- Tissue, A microcolorimetric method of determination of free and conjugated methol in blood and —s. 277.
- Tissues. On the method of quantitative estimation of glutathione in —. 75.
- TOMIYAMA, Tetsuo. Studies on the stick antimony electrode. I. The degree of stability of electrode potential and its effect on the relation between pH and E.M.F. 285.
- Typhoid urine, Studies on the diazobody in — —. 379.

## U

- URAKI, Ziro. Bedeutung über Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXIX. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Gewebsoxydation und auf die Kohlenhydratverbrennung. 207.
- Urine, On the toxicity of — and serum proteic acid fraction. 457.

## V

- Vitamin D, Ergosterine und —. 1.

## W

- Wheat plant, A contribution to the biochemistry of the — —. 199.

## Y

- YAMASAKI, Kazumi. Beiträge zur Kenntnis der Hammarstensen Reaktion der Cholsäure. 311.
- YAMASAKI, Kazumi. Vorkommen der Taurocholsäure der Hühnergalle. 323.
- YAMAZOE, Samuro. Influence of glutathione and monoiodoacetic acid on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by animal tissues. 445.

## Z

- Zea Mays, A contribution to the biochemistry of seed germination with particular reference to — —. 173.



檢

印



# Contents

No. 3, November, 1933.

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Bestimmung der Blutgallensäuren. II. Mitteilung. Eine neue in der Praxis leicht ausführbare Bestimmungsmethode der Gallensäuren im Blutserum .....	345
TANAKA, Toshiyuki. Einfluss der Milz auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung .....	369
MIYAZAKI, Masaki. Studies on the diazo-body in typhoid urine .....	379
MAKINO, Hiroshi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweisstoffwechsel. II. Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber während der Winterzeit .....	387
KOTAKE, Y. sr., KOTAKE, Y. jr. und TANIGUCHI, I. Zum Desaminierungsvorgang der Aminosäuren im tierischen Organismus .....	395
KURANAMI, Teikichi. Klinische und experimentelle Untersuchungen über Bromstoffwechsel. II. Über Beziehungen zwischen Blutbromgehalt und innerer Sekretion .....	417
YAMAZOYE, Samuro. Influence of glutathione and moniodoacetic acid on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by animal tissues .....	445
GAMO, Yoshio. On the toxicity of urine and serum proteic acid fraction .....	457
ISHIDA, Inao. Über den Calcium- und Phosphorstoffwechsel. Einfluss des Carotins und Gallosterins .....	479